



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE EDUCAÇÃO FÍSICA E DESPORTOS
PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* - MESTRADO EM EDUCAÇÃO FÍSICA

JÓCTAN PIMENTEL CORDEIRO

**INFLUÊNCIA DO TREINAMENTO FÍSICO AERÓBIO
SOBRE A MORFOLOGIA E FUNÇÃO CARDÍACA DE
RATOS RESISTENTES À OBESIDADE**

VITÓRIA
2016

JÓCTAN PIMENTEL CORDEIRO

**INFLUÊNCIA DO TREINAMENTO FÍSICO AERÓBIO
SOBRE A MORFOLOGIA E FUNÇÃO CARDÍACA DE
RATOS RESISTENTES À OBESIDADE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* - Mestrado em Educação Física do Centro de Educação Física e Desportos, da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Educação Física.

Orientador (a): Profa. Dra. Ana Paula Lima Leopoldo

VITÓRIA
2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
CENTRO DE EDUCAÇÃO FÍSICA E DESPORTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM EDUCAÇÃO FÍSICA

**REGISTRO DE JULGAMENTO DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DO
CANDIDATO AO GRAU DE MESTRE PELO PPGEF/CEFD/UFES**

Nº. Matrícula do Candidato: 2014130918

Comissão Julgadora que examinou a Dissertação de Mestrado intitulada "**Influência do treinamento físico aeróbico sobre a morfologia e a função cardíaca de ratos resistentes à obesidade**" elaborada, apresentada e defendida publicamente por Jóctan Pimentel Cordeiro, no dia 17 de maio de 2016, decidiu aprovar a referida Dissertação, habilitando o candidato a obter o título de **MESTRE EM EDUCAÇÃO FÍSICA**, do Programa de Pós-Graduação em Educação Física do Centro de Educação Física e Desportos da Universidade Federal do Espírito Santo.

Vitória, 17 de maio de 2016.

Profª Drª Ana Paula Lima Leopoldo - Orientadora (UFES)

Prof. Dr. Rogério Graça Pedrosa (UFES)

Prof. Dr. Lucas Guimarães Ferreira (UFES)

Dedicatória

Dedico esse trabalho à minha família,

em especial à minha mãe por não medir esforços para garantir que, eu e meus irmãos, tivéssemos a melhor educação possível. Como fruto desse esforço, nada mais justo que dar mérito aos principais responsáveis por esta conquista.

Dedico ao meu pai, que descansa em Deus. Somente foi capaz de ver minha aprovação na universidade federal, mas, infelizmente, não pôde presenciar a conclusão da graduação em Educação Física e nem, tampouco, o término desse trabalho. Sei que estaria orgulhoso!

Ao meu irmão mais velho, *Hosenan*, que trabalhou com Educação Física e sonhava em seguir esse caminho. Hoje sei que realizo um de seus sonhos.

Ao meu irmão do meio, *Géter*, que me proporcionou suporte financeiro e motivacional para garantir essa conquista. Esse trabalho é nosso!

À todos meus familiares, os quais sei que se orgulham de mim.

Agradecimentos

Primeiramente à Deus, por me agraciar com o dom da vida todos os dias. Pelas barreiras derrubadas, pedras desviadas dos meus caminhos e por oportunidades concedidas.

À minha família, em especial, à minha mãe (*Marlene Pimentel*) e aos meus irmãos (*Géter Pimentel Cordeiro e Hosenan Pimentel Cordeiro*). Sem dúvida, foi graças aos seus esforços, incentivos e todo suporte necessário para que me mantivesse estudando, que consegui galgar esse caminho. Sou grato à Deus todos os dias pela família que me deu, reconheço seus esforços por mim. Amo vocês!

À minha namorada (Mayara), que passa por todas as dificuldades ao meu lado, que não mede esforços para me ajudar, seja qual for a situação. Pela paciência e amor.

À minha orientadora *Profa. Dra. Ana Paula Lima Leopoldo*, que apostou em um jovem estudante do quarto período de graduação em Educação Física. Essa parceria deu tão certo que passamos por duas iniciações científicas, um TCC e agora uma dissertação de mestrado. Sou muito grato por me dar a chance de caminhar atrás de um futuro mais próspero tanto pessoal quanto profissional.

“Quando era criança, dizia que seria cientista quando crescesse:

- Quero fazer robôs... Eu dizia.

Como a vida é interessante, percorri caminhos bem diferentes, daqueles que pareciam necessários para realizar esse sonho. E olha onde estou, hoje tenho orgulho de dizer, faço ciência.”

Aos “irmãos” da família LAFIBE. Aqueles que passaram pelo laboratório e hoje seguem seu caminho e aos novos integrantes, todos têm uma parcela de colaboração nesse trabalho, direta ou indiretamente. Somos mais que um grupo. O apoio dado vai muito além do profissional, é cuidado e companheirismo em diversas situações. À vocês meu muito obrigado!

Aos amigos que conquistei dos laboratórios vizinhos, LAFEX e LAFEC. Pessoas incríveis que tiveram grande influência na pessoa e profissional que sou. Sem dúvida criamos laços sólidos, que se estendem para além do perímetro universitário.

À FAPES pelo apoio financeiro.

Um nó, dois nós;
Eu, mais um ou mais, um ser simplesmente;
O eu poético do verdadeiro encontro;
Nó, no plural, nós
Oficina-G3

Agradecimentos Especiais

Ao *Prof. Dr. André Soares Leopoldo* (coorientador), por dividir com a *Profa. Dra. Ana Paula Lima Leopoldo* (orientadora) o peso da responsabilidade da orientação dessa dissertação. Sem seus esforços e cobranças não teríamos conseguido finalizar esse trabalho com tal qualidade. Sua responsabilidade com a pesquisa séria e sua dedicação ao trabalho são admiráveis.

Obrigado!

Ao *Prof. Dr. Antonio Carlos Cicogna*, pelo apoio e oportunidade de crescimento científico/profissional ao abrir as portas de seu laboratório para que eu aprendesse algumas técnicas e procedimentos laboratoriais. Foi um período curto mas enriquecedor.

Ao amigo, *Prof. Me. Vitor Loureiro da Silva*, por realizar grande parte do trabalho árduo de tratamento e treinamento dos animais, bem como por participar de toda eutanásia. Sua ajuda foi imprescindível e por isso uma parte desse trabalho também é sua!

Muito obrigado!

Epígrafe

O SENHOR é o meu pastor, nada me faltará.

Deitar-me faz em verdes pastos, guia-me mansamente a águas tranquilas.

Refrigera a minha alma; guia-me pelas veredas da justiça, por amor do seu nome.

Ainda que eu andasse pelo vale da sombra da morte, não temeria mal algum, porque tu estás comigo; a tua vara e o teu cajado me consolam.

Salmos 23:1-4

SUMÁRIO

Lista de Quadros	vii
Lista de Figuras	viii
Lista de Tabelas	ix
Lista de Abreviaturas	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO	7
3. MATREIAL E MÉTODOS	7
3.1. Animais.....	7
3.2. Protocolo experimental.....	7
3.2.1. Composição nutricional das dietas.....	8
3.2.2. Critério de determinação da resistência à obesidade, composição e redistribuição dos grupos.....	10
3.2.3. Protocolo de treinamento físico.....	11
3.3. Avaliação nutricional.....	12
3.3.1. Perfil nutricional.....	12
3.3.1.1. Ingestão alimentar, ingestão calórica e eficiência alimentar.....	12
3.3.2. Curva glicêmica.....	13
3.4. Eutanásia.....	13
3.5. Parâmetros analisados.....	14
3.5.1. Pressão arterial sistêmica.....	14
3.5.2. Perfil glicêmico e lipídico.....	14
3.5.3. Concentração plasmática de insulina e leptina.....	15
3.5.4. Índice de resistência sistêmica à insulina.....	15
3.6. Músculo papilar isolado.....	15
3.6.1. Parâmetros funcionais.....	17
3.6.2. Protocolo funcional.....	18
3.6.2.1. Protocolo funcional em condição basal.....	19
3.6.2.1.1. Manobras inotrópicas e lusitrópicas.....	19
3.6.2.1.1.1. Potenciação pós-pausa.....	19

3.6.2.1.1.2. Elevação da concentração extracelular de cálcio.....	19
3.7. Caracterização cardíaca post mortem.....	20
3.7.1. Estrutura do coração.....	20
3.7.2. Área seccional transversa (AST).....	20
3.7.3. Colágeno intersticial miocárdico.....	21
3.7.4. Determinação do teor de água nos tecidos cardíaco, pulmonar e hepático.....	22
3.8. Análise estatística.....	22
4. RESULTADOS	22
4.1. Caracterização do momento inicial da obesidade.....	23
4.2. Caracterização da resistência à obesidade.....	23
4.3. Influência do treinamento físico.....	27
5. DISCUSSÃO	37
5.1. Resistência à obesidade.....	37
5.1.1. Resistência à obesidade, morfologia e função cardíaca.....	42
5.2. Protocolo de treinamento físico.....	45
5.2.1. Resistência à obesidade e treinamento físico.....	47
5.2.1.1. Influência do treinamento físico na morfologia e função cardíaca na resistência à obesidade.....	49
6. CONCLUSÃO	49
7. REFERÊNCIAS	51

Lista de Quadros

Quadro 1 – Composição nutricional das dietas (%).....9

Quadro 2 – Protocolo de treinamento físico.....12

Lista de Figuras

Figura 1. Representação esquemática da mobilização de Ca^{2+} durante a contração e o relaxamento miocárdico.....	5
Figura 2. Representação esquemática do critério utilizado para composição dos grupos.....	10
Figura 3. Evolução do peso corporal durante o período de indução à obesidade de 5 semanas.....	23
Figura 4. Evolução do peso corporal durante protocolo de indução à obesidade e exposição à dieta, até a 20ª semana.....	24
Figura 5. Evolução do peso corporal durante o protocolo de indução à obesidade e exposição à dieta durante 32 semanas.....	26
Figura 6. Evolução do peso corporal durante o período de exposição à dieta de 32 semanas.....	30
Figura 7. Níveis séricos de insulina e leptina após 12 semanas de treinamento físico.....	32
Figura 8. Área sob a curva (ASC) glicêmica.....	32
Figura 9. Área seccional transversa realizada em fragmentos de ventrículo esquerdo.....	34
Figura 10. Deposição de colágeno em fragmentos de ventrículo esquerdo.....	34
Figura 11. Potencial pós-pausa do músculo papilar isolado após 20 semanas de tratamento e 12 semanas de treinamento físico.....	36
Figura 12. Efeitos da elevação da concentração de cálcio extracelular de 0,5 a 2,5 mM no músculo papilar isolado após 20 semanas de tratamento e 12 semanas de treinamento físico.....	37

Lista de Tabelas

Tabela 1. Características nutricionais durante protocolo de indução à obesidade e exposição à dieta.....	25
Tabela 2. Caracterização da resistência à obesidade ao término do protocolo experimental.....	27
Tabela 3. Características nutricionais durante o protocolo de treinamento físico.....	29
Tabela 4. Características bioquímicas, hormonais e pressão arterial sistólica.....	31
Tabela 5. Características morfológicas do coração após 32 semanas.....	33
Tabela 6. Teor de água nos tecidos cardíaco, pulmonar e hepático.....	35

Lista de Abreviaturas

ANOVA – Análise de variância	NCX – Trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$
ASC – Área sob a curva	Ob – Grupo de animais obeso
AST – Área seccional transversa	PA – Pressão arterial
AT – Átrio	PAS – Pressão arterial sistólica
C – Grupo de animais controle	PCF – Peso corporal final
Ca^{+2} - Cálcio	PCI – Peso corporal inicial
CaMKII – Cálcio calmodulina quinase	PKC – Proteína quinase C
cAMP – Adenosina monofosfato cíclica	PLB – Fosfolambam
CEUA - Comissão de Ética no Uso de	PN – Peso <i>in natura</i>
CEx – Grupo de animais controles submetidos ao treinamento físico	PPP – Potenciação pós-pausa
CSQ - Calsequestrina	PSec – Peso seco
Animais de Experimentação Científica	PS – Ponto de separação
DH – Dieta hiperlipídica	RO – Resistência à obesidade
DP – Dieta padrão	ROb – Grupo de animais resistentes à obesidade
+dT/dt - Velocidade máxima de variação da tensão desenvolvida	RObEx – Grupo de animais resistentes à obesidade submetidos ao treinamento físico
-dT/dt - Velocidade máxima de variação de decréscimo da tensão desenvolvida	RNA_m – RNA mensageiro
EA – Eficiência alimentar	RS – Retículo sarcoplasmático
EF – Exercício físico	RyR – Rianodina
GTT – Teste de tolerância à glicose	Ser¹⁶ – Serina ¹⁶
HA – Hipertensão arterial	SERCA2a – Bomba de cálcio do sarcolema
HE – Hematoxilina-eosina	TD – Tensão máxima desenvolvida
HDL – Lipoproteína de alta densidade	TF – Treinamento físico
IA – Ingestão alimentar	Thr¹⁷ – Treonina ¹⁷
IC – Intervalo de confiança	TnC – Troponina C
ICal – Ingestão calórica	TR – Tensão de repouso
LDL – Lipoproteína de baixa densidade	TVM – Teste de velocidade máxima
L_{máx} - Força ou tensão máxima desenvolvida em contração isométrica	VE – Ventrículo esquerdo
	VD – Ventrículo direito
	VMC – Velocidade máxima de corrida

RESUMO

Poucos estudos têm avaliado a função cardíaca em modelos de resistência à obesidade (ROb). Os mecanismos envolvidos no transiente de cálcio na disfunção cardíaca em modelos de ratos ROb ainda não são bem determinados. O presente estudo foi designado para o teste da hipótese que a dieta hiperlipídica insaturada promove disfunção miocárdica em ratos ROb e este dano é observado no trânsito de Ca^{+2} extracelular. Porém, algumas estratégias têm sido utilizadas como fatores de intervenção tanto para prevenção quanto de tratamento de doenças cardíacas, dentre estas, destaca-se o treinamento físico (TF) como terapia não farmacológica. No presente estudo foram utilizados 80 ratos *Wistar*, com 30 dias de idade, e submetidos a protocolo de indução e exposição à obesidade, sendo 5 semanas de indução e 15 de exposição, totalizando 20 semanas consecutivas. Os ratos foram randomizados em dois grupos: a) DP: alimentados com dieta padrão (n = 40) e b) DH: alimentados com dieta hiperlipídica (n = 40) insaturada. Os animais foram distribuídos quanto à ausência ou presença do TF aeróbio de moderada intensidade (70% do TVM) por 12 semanas, controle (C; n=12), controle submetido ao protocolo de treinamento físico (CEX; n=14), resistente à obesidade (ROb; n=9) e resistente à obesidade submetido ao protocolo de treinamento físico (RObEx; n = 10). Foram analisados: peso corporal (PC), percentual de gordura (% GC), índice de adiposidade, parâmetros nutricionais e metabólicos e pressão arterial sistólica final (PAS). O processo de remodelação cardíaca foi avaliado *post mortem* por estudos macroscópicos e microscópicos. A análise funcional cardíaca foi realizada *in vitro* por meio de manobras inotrópicas e lusitrópicas utilizando a técnica de músculo papilar isolado do VE. A comparação dos grupos experimentais foi realizada por ANOVA para dois fatores, complementada com teste de comparações múltiplas de *Bonferroni*. O nível de significância considerado para todas as variáveis foi de 5%. Após 32 semanas de protocolo experimental, os animais do grupo ROb apresentaram ganho de peso, peso corporal final, depósitos de gordura retroperitoneal, visceral e epididimal, bem como o somatório dos depósitos de gordura e o índice de adiposidade similares ao grupo C. Porém, a ROb apresentou intolerância à glicose e aumento dos níveis séricos de LDL. Os animais ROb não apresentaram alteração no comportamento da pressão arterial sistólica e do HDL. O estudo macroscópico *post mortem* mostrou que a ROb apresenta menores valores

de peso das câmaras cardíacas e do coração total, fato este, constatado por menor deposição de colágeno intersticial, com preservada área seccional transversa de cardiomiócitos de VE. Em adição, a função cardíaca *in vitro* não foi prejudicada nos animais RO_b. O TF aeróbio de intensidade moderada foi eficiente em diminuir a maioria dos parâmetros de composição corporal relacionados à deposição de gordura, bem como normalizou os elevados níveis séricos de LDL, observados nos animais RO_b sedentários. Porém, não foi capaz de diminuir a intolerância à glicose desses animais. O TF não promoveu alterações tanto na morfologia quanto na função cardíaca. Entretanto, ratos RO_b quando submetidos à DH por prolongado período e ao TF parecem ter seus valores pressóricos aumentados. Em conclusão, os animais RO_b submetidos a prolongado período de DH insaturada apresentam dislipidemia, intolerância à glicose e menor coração por menor deposição de colágeno, sem prejuízos na função cardíaca. O TF aeróbio não promoveu alterações na morfologia e função cardíaca.

ABSTRACT

Few studies have assessed the cardiac function in obesity resistance (OR) models. The mechanisms involved in calcium transient in cardiac dysfunction in OR mouse models are not well determined. This study was designed to test the hypothesis that the unsaturated fat diet promotes myocardial dysfunction in OR rats and this damage is observed in extracellular Ca^{2+} transient. However, some tools have been used as an intervention factors for both prevention and treatment of heart disease, among them, stands out the physical training (PT) as non-pharmacological intervention. In the present study, we used 80 male *Wistar* rats, 30 days old, and subjected to exposure and induction protocol obesity, 5 weeks of induction and 15 weeks of exposure to obesity, a total of 20 consecutive weeks. The rats were randomized into two groups: a) SD: standard diet fed ($n = 40$) and b) HFD: fed with unsaturated high fat diet ($n = 40$). The animals were redistributed as the absence or presence of aerobic PT moderate intensity (70% of TVM) for 12 weeks. In the second stage of the experimental protocol, the study consisted of four groups: control (C, $n = 12$), control submitted to the physical training protocol (CPT; $n = 14$), obesity-resistant (OR; $n = 9$) and obesity-resistant subjected to physical training protocol (ORPT; $n = 10$). They were analyzed: body weight (BW), body fat percentage (BF%), adiposity index, nutritional and metabolic parameters and systolic blood pressure (SBP). The process of cardiac remodeling was assessed by *post mortem* macroscopic and microscopic studies. The cardiac function analysis was performed *in vitro* by means of maneuvering inotropic and lusitropic using the isolated papillary technique muscle of the LV. The comparison of the experimental groups was performed by ANOVA for two factors, supplemented with multiple comparison test of *Bonferroni*. The level of significance for all variables was 5%. After 32 weeks of experimental protocol, OR animals group showed weight gain, final body weight, sum of fat deposits and adiposity index similar to group C. However, OR showed glucose intolerance and increased serum levels of LDL. The OR animals showed no change in the behavior of SBP and HDL. Macroscopic *post mortem* study showed that OR has lower weight values of the heart chambers and total heart, a fact, evidenced by lower deposition of interstitial collagen, with preserved cross-sectional area of LV cardiomyocytes. In addition, *in vitro* cardiac function was not impaired in animals OR. Aerobic PT moderate intensity was effective in decreasing the majority of body composition

parameters related to fat deposition and normalized the elevated serum LDL levels observed in the sedentary animals OR. However, it was not able to decrease glucose intolerance in these animals. PT did not changed both morphology as cardiac function. However, OR rats when subjected to unsaturated HFD for a long period and PT seem to have increased their pressure values. In conclusion, the OR animals subjected to prolonged unsaturated HFD period have dyslipidemia, glucose intolerance and lower heart by less collagen deposition, without reducing the cardiac function. Aerobic PT did not change the morphology and cardiac function.

1 INTRODUÇÃO

A obesidade é uma doença multifatorial complexa influenciada por fatores genéticos e ambientais (ABEL; LITWIN; SWEENEY, 2008; AKIEDA-ASAI et al., 2013) e é caracterizada por excesso de tecido adiposo em relação à massa magra com magnitude suficiente para causar danos à saúde (KOPELMAN, 2000). Estudo de coorte prospectiva avaliou o aumento do índice de massa corporal associado ao aumento de causas específicas de mortalidade, em 38.080 indivíduos japoneses durante 20 anos. Os achados mostram que os participantes que permaneceram obesos, durante o período do estudo, apresentaram aumento de 126% de risco de mortalidade, enquanto o grupo com peso normal apresentou 42% (SHIMAZU et al., 2009).

A obesidade está ligada diretamente ao desenvolvimento de fatores de risco associados à alterações metabólicas e inflamatórias (BUETTNER; BUETTNER, 2007) bem como ao prejuízo da função e morfologia cardíaca (DUŠAN et al., 2015; LEOPOLDO et al., 2011; LIMA-LEOPOLDO et al., 2014). Em adição, Rider et al. (2015) mostraram que mesmo na ausência de fatores de risco cardiovasculares, a obesidade está associada disfunção sistólica e diastólica.

Dentre os prejuízos causados pela obesidade, a disfunção cardíaca tem tomado destaque em trabalhos que discutem o tema nos últimos anos (FERRON et al., 2015; LEOPOLDO et al., 2011; RIDER et al., 2015). Estudo de coorte retrospectiva, avaliando adolescentes norte americanos de diferentes etnias, mostrou que o excesso de peso foi associado à hipertensão arterial (HA) e remodelação cardíaca em 47% dos avaliados, independentemente de gênero e etnia (HANEVOLD et al., 2004). Corroborando estes achados, Dusan et al. (2014) relatam que 47,6% das crianças e adolescentes obesos avaliados eram hipertensos e dentre, estes, 16,3% apresentaram hipertrofia ventricular esquerda. Em adição, outros autores destacam que o peso corporal excessivo está associado ao aumento da sobrecarga cardíaca em crianças e adolescentes e promove remodelação anormal na geometria cardíaca que se mantém até a vida adulta (SANCHEZ; SINGH, 2014). Desse modo, o acúmulo exagerado de gordura corporal está associado ao aumento da sobrecarga cardíaca (CUSPIDI et al., 2014), observado tanto na pré-carga principalmente



por hipertensão sistêmica gerada por aumento do volume plasmático, (ASHRAFIAN; ATHANASIOU; LE ROUX, 2011) quanto na pós-carga por aumento da pressão arterial, maior expressão de endotelina e leptina, resistência à insulina, hiperatividade simpática e do sistema renina-angiotensina, dentre outros (DE SIMONE, 2007). Esses aumentos na pré-carga e pós-carga, principalmente no ventrículo esquerdo, promovem remodelação anormal na geometria cardíaca em indivíduos obesos, acarretando hipertrofia excêntrica e concêntrica, respectivamente (CUSPIDI et al., 2014). Sanchez e Singh (2014) relatam que a interação complexa de fatores hemodinâmicos e metabólicos é a responsável por esses achados e são influenciados pelo estilo de vida. A velocidade com que a obesidade é desenvolvida sugere que fatores comportamentais e ambientais se sobrepõem aos fatores intrínsecos, o que confere a esta doença característica de influência causal predominantemente extrínseca (STEIN; COLDITZ, 2004).

O estudo da obesidade se torna um tanto quanto complexo em virtude da inviabilidade de aplicação de algumas técnicas invasivas em seres humanos. Portanto, uma importante alternativa de estudo capaz de reproduzir características da obesidade, tais como as observadas na população, é a utilização de modelos experimentais que possibilitam a identificação de agressões cardíacas por meio de manobras invasivas capazes de proporcionar informações mais detalhadas sobre o problema. Os estudos adotam modelos de características diversas, que podem variar entre diferentes espécies de modelos animais e modificações genéticas (VEYRAT-DUREBEX et al., 2011), as quais são capazes de reproduzir as características comumente visualizadas na população obesa. Dentre as espécies mais comuns podem-se destacar os porcos, cachorros, coelhos e ratos. Porém, em sua grande maioria, os roedores têm sido os mais utilizados pelos pesquisadores por apresentarem mais fácil tratamento e manuseio (WANG; WISLOFF; KEMI, 2010). O tratamento é um fator de extrema importância quando se pensa na utilização de modelos experimentais para obtenção do ganho de peso corporal, uma vez que, contrapondo os modelos genéticos, os animais submetidos à dieta hiperlipídica e/ou hipercalórica retratam características mais fidedignas da obesidade, assim como aquelas observadas no ser humano (JACKMAN et al., 2006). No entanto, sabe-se que animais apresentam diferentes respostas ao desenvolvimento da



obesidade induzida por dieta, o que ocasiona fenótipos obesos e magros mesmo com alto consumo de dieta hiperlipídica, comportamento similar ao encontrado em seres humanos (JOO et al., 2011; MACLEAN et al., 2004).

Por volta de três décadas, pesquisadores têm dedicado estudo a uma terceira categoria de animais, os quais mesmo quando alimentados com dietas hiperlipídicas não se tornam obesos, apresentando ganho de peso similar ou inferior ao de animais alimentados com dieta de baixa concentração lipídica (PAGLIASSOTTI et al., 1995). Esta característica confere a estes ratos capacidade de resistir à condição morfológica da obesidade, classificando-os como resistentes à obesidade (ROb). Os ratos ROb apresentam menor ganho de peso e depósitos de gordura corporal quando comparados aos obesos prontos, apesar da similar ingestão alimentar (AKIEDA-ASAI et al., 2013; TULIPANO et al., 2004). Assim, a resistência à obesidade parece refletir a capacidade desses animais apresentarem maior gasto energético como resposta adaptativa ao alto consumo calórico, o que se sobrepõe ao ganho de peso (JACKMAN et al., 2006; MADSEN et al., 2010).

No entanto, não está claro se ratos ROb possuem, também, capacidade de se manterem isentos das agressões cardíacas acarretadas pela obesidade (DU TOIT; NABBEN; LOCHNER, 2005; LEOPOLDO et al., 2010, 2011; RELLING et al., 2006; REN et al., 2008). Poucos estudos avaliaram a função cardíaca e os mecanismos responsáveis pela promoção da disfunção miocárdica correlacionados com a resistência à obesidade. Pesquisa com animais submetidos à dieta de moderado teor lipídico, por 12 semanas, não encontrou anormalidades na função cardíaca em ratos ROb (CARROLL; ZENEBE; STRANGE, 2006). Em contrapartida, Louis et al. (2012) mostraram que ratos ROb submetidos à dieta hiperlipídica por 17 semanas apresentaram aumento do tempo de relaxamento isovolumétrico miocárdico.

Diversos fatores têm sido associados à disfunção cardíaca em modelos experimentais, dentre eles o trânsito de cálcio (LEOPOLDO et al., 2011; RELLING et al., 2006). O trânsito de cálcio (Ca^{+2}) intracelular é um dos principais mecanismos reguladores da contratilidade e relaxamento cardíaco (BÖGEHOLZ; MUSZYNSKI; POTT, 2012). A contração cardíaca inicia-se com um estímulo elétrico que se propaga pela membrana celular dos miócitos gerando a abertura dos canais lentos de Ca^{+2} (canais L) com consequente



entrada deste íon em concentrações extracelulares para o meio intracelular. O influxo de cálcio estimula os receptores de rianodina (RyR) do retículo sarcoplasmático (RS) que permitem a saída do Ca^{+2} armazenado. Este processo aumenta a concentração de Ca^{+2} citosólico, o que possibilita a ligação desse íon com a troponina-C acarretando a interação actina-miosina. A intensidade da contração depende tanto da quantidade de Ca^{+2} quanto da sensibilidade dos miofilamentos a esse íon. Quando a concentração intracelular de Ca^{2+} começa a diminuir, principalmente pela recaptura de Ca^{+2} pela bomba de Ca^{2+} do RS (SERCA2a), inicia-se o relaxamento. A atividade da SERCA2a é modulada diretamente pela fosfolambam (PLB) que em seu estado desfosforilado inibe a afinidade da SERCa2a ao Ca^{+2} . A PLB pode ser fosforilada em dois sítios de ligação distintos: na Treonina17 (Thr^{17}) pela ativação cálcio calmodulina quinase (CaMKII) estimulada pelo aumento do Ca^{+2} citosólico e na Ser¹⁶ pela proteína quinase C (PKC) e/ou pelo cAMP e cGMP proteínas quinases. Após aumento da atividade da proteína quinase A (PKA) ativada pelo cAMP decorrente da estimulação β -adrenérgica, a PLB é fosforilada e há a recaptura do Ca^{+2} pela SERCA2a ao RS. Outras proteínas, como o trocador $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{+2}$ (NCX) e a bomba de Ca^{+2} do sarcolema atuam como reguladores do efluxo de Ca^{+2} intracelular miocárdico (BERS, 2002; ULLRICH; VALDIVIA; NIGGLI, 2012) (Figura 1).



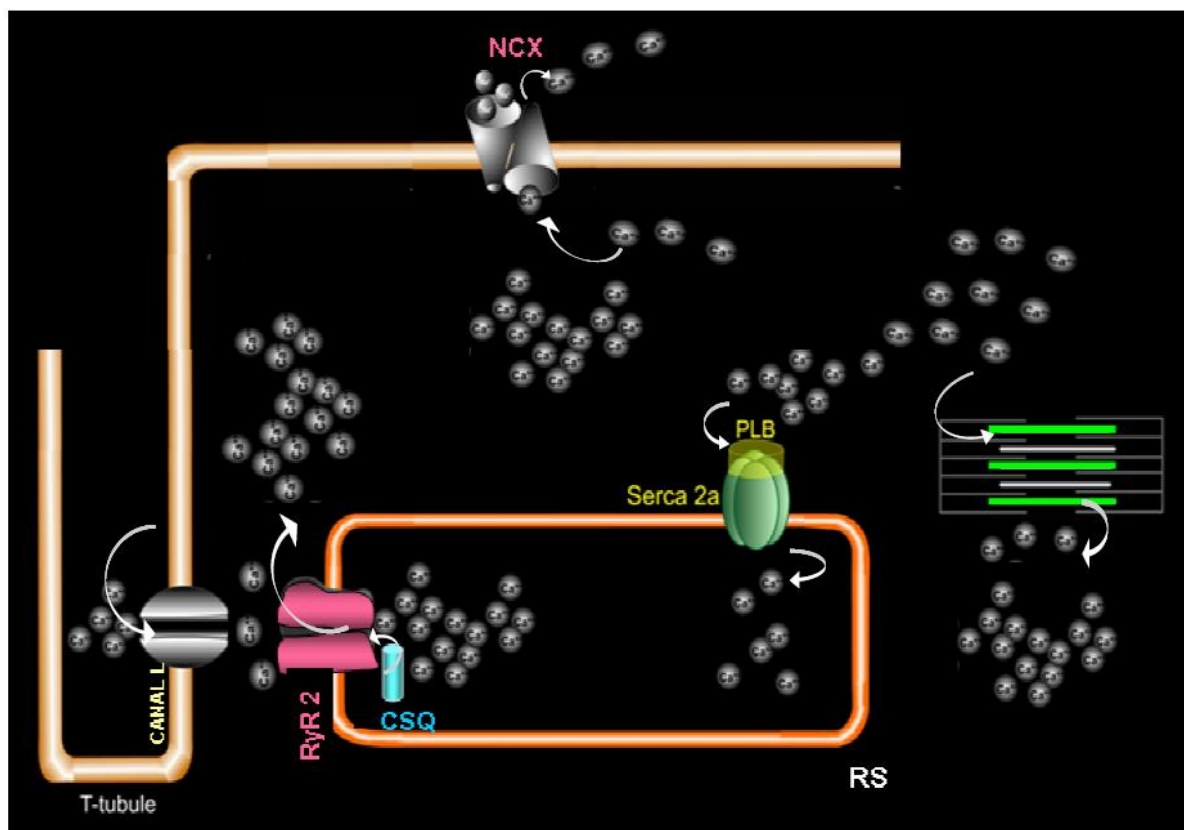


Figura 1. Representação esquemática da mobilização de Ca^{2+} durante a contração e o relaxamento miocárdico. Serca2a: ATPase de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático; PLB: fosfolambam; RyR: receptor rianodina; CSQ: calsequestrina; NCX: trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ e Canal L: canal lento de Ca^{2+} . Modificado de Aline Villa Nova Bacurau, 2006.

Em virtude do impacto negativo causado ao coração por hábitos alimentares inadequados e sedentarismo, medidas de intervenção vem sendo desenvolvidas e estudadas. Por volta de duas décadas, estudos têm utilizado o exercício e o treinamento físico (TF) como forma de intervenção, pois dentre seus múltiplos benefícios, apresentam característica cardioprotetora e de reversão de anormalidades no coração (FARID et al., 2005; HAMED; ABD-ELLATIF, 2014; KEMI et al., 2007; MOINUDDIN; LEEHEY, 2008; WISLØFF et al., 2001, 2002).

Paulino et al. (2010) evidenciam o papel do treinamento físico como estratégia capaz de reduzir o peso corporal e melhorar a função cardíaca associada ao controle autonômico na obesidade humana. Em adição, o exercício físico aumenta a expressão das proteínas do trânsito de Ca^{2+} e melhora a função cardíaca (CARNEIRO-JÚNIOR et al., 2013; LOCATELLI; DE ASSIS; ISOLDI, 2014; PINHEIRO et al., 2007; WISLØFF et al., 2001). Outros



estudos (KEMI et al., 2007; PAULINO et al., 2010; WISLØFF et al., 2002) utilizaram esta forma de intervenção para análise da função cardíaca em modelos experimentais, e identificaram que o TF apresenta influência direta na regulação e modulação do trânsito de Ca^{+2} intracelular. Mudança na dinâmica do Ca^{+2} e maior sensibilidade aos miofilamentos são possíveis mecanismos relacionados à otimização do desempenho cardíaco após período de treinamento (LOCATELLI; DE ASSIS; ISOLDI, 2014; WANG et al., 2008; WISLØFF et al., 2002). O aumento na recaptura de Ca^{+2} pela elevação da atividade da SERCA2a é um evento específico, o qual pode ser modulado pelo exercício físico (WISLØFF et al., 2002). Esse processo é desencadeado pela fosforilação da PLB na Ser¹⁶ via sistema β_1 -adrenergico e na Thr¹⁷ via influxo de cálcio pelos canais L e maior atividade da CaMKII (BERS, 2002).

Carneiro-Júnior et al. (2013) avaliando a função cardíaca, por meio de cardiomiócito isolado de ratos submetidos ao treinamento de endurance por 8 semanas, identificaram melhora na contração e diminuição do tempo de relaxamento nos animais treinados em relação ao grupo não treinado. O benefício funcional foi confirmado pela maior expressão da SERCA2a e da PLB fosforilada na Ser¹⁶. Em suma, o treinamento físico é capaz de atenuar a hipertrofia patológica, aumentar a função contrátil do miócito, a expressão protéica de SERCA2a e NCX, os níveis de PLB fosforilada na Ser¹⁶, bem como melhorar a sensibilidade dos miofilamentos ao Ca^{+2} em modelos experimentais (CARNEIRO-JÚNIOR et al., 2013; PACAGNELLI et al., 2014; PINHEIRO et al., 2007; WISLØFF et al., 2002).

Dessa maneira, contrapondo os métodos de tratamento da obesidade que utilizam medicamentos e/ou outras substâncias (ALONSO et al., 2012; BROWN et al., 2001; CAO et al., 2011), o TF aparece como uma importante ferramenta de intervenção não farmacológica na diminuição da remodelação (PACAGNELLI et al., 2014; PINHEIRO et al., 2007; WISLØFF et al., 2002) e melhora da função cardíaca (KEMI et al., 2007; WANG et al., 2008; WISLØFF et al., 2001). No entanto, há escassez de estudos que avaliaram a função cardíaca de ratos resistentes à obesidade e sua relação com o treinamento físico.

O comportamento da função cardíaca de ratos resistentes à obesidade, por meio de dieta hiperlipídica insaturada, ainda é um tanto obscuro, bem como



a ação do treinamento físico como fator cardioprotetor nessa condição. Portanto, torna-se necessária a investigação dos mecanismos responsáveis pelo ciclo cardíaco em animais resistentes à obesidade submetidos ao treinamento físico.

2 OBJETIVO

Investigar a morfologia e função cardíaca de ratos resistentes à obesidade submetidos a prolongado período de dieta hiperlipídica insaturada, bem como a influência do treinamento físico como fator cardioprotetor de possíveis anormalidades cardíacas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1. - Animais

No presente estudo foram utilizados 80 ratos *Wistar*, com 30 dias de idade, mantidos em gaiolas individuais de polipropileno com tampas de arame cromado forradas com maravalha de *Pinus* esterilizada, temperatura ambiente ($24 \pm 2^\circ\text{C}$), umidade controlada ($55 \pm 5\%$) e ciclo de iluminação invertido (12h/12h) com a finalidade de aumentar rendimento no treinamento e evitar efeitos adversos provenientes da alteração do ritmo circadiano (MADSEN et al., 2010), tendo em vista que ratos possuem hábitos noturnos (VGONTZAS et al., 2002). Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com o “*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*” publicado pelo “*U.S. National Institutes of Health*” e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais de Experimentação Científica (CEUA) da Universidade Federal do Espírito Santo, sob o protocolo 1036-2013 em 29/08/2013.

3.2. - Protocolo experimental

Após período de 7 dias para aclimação, os ratos foram inicialmente randomizados em dois grupos: a) alimentados com dieta padrão (DP, n= 40) e b) alimentados com dieta hiperlipídica (DH, n= 40) insaturada. Os animais do

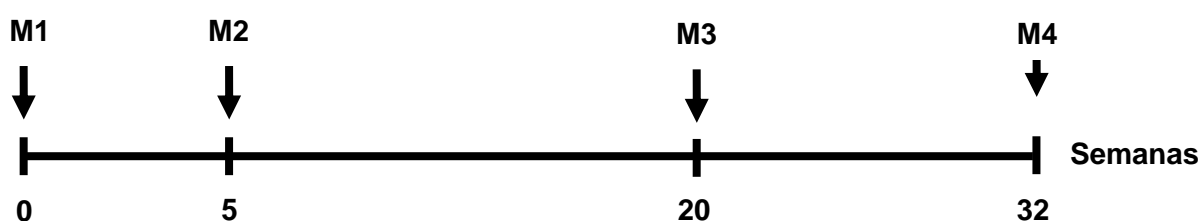


grupo DP e DH receberam 50g de ração e após 24 horas a quantidade não ingerida foi mensurada. A oferta de água foi *ad libitum*.

Após o período de aclimação e randomização dos animais, os mesmos foram expostos ao protocolo experimental de acordo com o tipo de dieta ofertada (padrão ou hipercalípídica). Os animais tratados com dieta hiperlipídica insaturada passaram por período de indução à obesidade com intuito de caracterização do momento inicial da obesidade. Este momento foi determinado por diferença estatística no valor médio do peso corporal entre os grupos experimentais, conforme descrito em estudos prévios realizados em nosso laboratório (LEOPOLDO et al., 2011; LIMA-LEOPOLDO et al., 2014). Após o período de indução à obesidade, os animais foram mantidos nessa condição por 15 semanas consecutivas, momento denominado de exposição à dieta.

O protocolo de indução e exposição à dieta perdurou 20 semanas consecutivas, sendo 5 semanas de indução à obesidade e 15 semanas de exposição à dieta e/ou obesidade.

O protocolo experimental total consistiu de um período de 32 semanas, sendo dividido em três momentos, conforme demonstrado no esquema a seguir: M1) indução à obesidade; M2) exposição à dieta e; M3) protocolo de treinamento físico aeróbio.



M1 = Início do protocolo experimental, indução à obesidade;

M2 = Início da obesidade;

M3 = Caracterização da obesidade e resistência à obesidade, redistribuição dos grupos para início do protocolo de treinamento físico;

M4 = Fim do protocolo experimental, eutanásia e início das análises do estudo.

3.2.1. - Composição nutricional das dietas

Os animais DP receberam dieta padrão para roedores contendo 12,3% de suas calorias provenientes de gordura, 57,9% de carboidratos e



29,8% de proteínas (RC Focus 1765, Agrocere[®], Rio Claro, São Paulo, Brasil). A ração padrão RC Focus 1765 é composta pelos seguintes ingredientes: fosfato bicálcico, óleo de soja degomado, cloreto de sódio, milho moído, aditivo antioxidante, farelo de soja, farelo de trigo, farinha de carne e ossos, farinha de peixe, suplemento mineral e vitamínico.

Os animais DH receberam um ciclo de quatro dietas hiperlipídicas insaturadas contendo 49,2% de suas calorias provenientes de gordura, 28,9% de carboidratos e 21,9% de proteínas (RC Focus 2413, 2414, 2415 e 2416, Agrocere[®], Rio Claro, São Paulo, Brasil), as quais apresentam a mesma composição nutricional, com exceção dos aditivos flavorizantes (queijo, bacon, chocolate ou baunilha). As rações hiperlipídicas insaturadas são constituídas de cloreto de sódio, caseína, soro de leite em pó, concentrado proteico de soja, milho integral moído, farinha de bolacha, fosfato bicálcico, carbonato de cálcio, óleo de milho, aditivos emulsificante e antioxidante, suplemento mineral e vitamínico, e foram fornecidos durante todo o protocolo experimental.

A composição nutricional das dietas padrão e hiperlipídica, mensurada pela empresa Agrocere[®], Rio Claro, São Paulo, Brasil, está apresentada no Quadro 1.

Quadro 1- Composição nutricional das dietas (%)

Componentes	Dieta	
	Padrão	Hiperlipídica insaturada
Proteína	22,0	20,0
Carboidrato	42,7	26,4
Gordura	4,0	20,0
Vitaminas e Minerais	11,3	12,1
Fibras	8,0	9,0
Umidade	12,0	12,5
Densidade calórica (kcal/g)	2,95	3,65
% Calorias da proteína	29,8	21,9
% Calorias do carboidrato	57,9	28,9
% Calorias da gordura	12,3	49,2



3.2.2. - Critério de determinação da resistência à obesidade, composição e redistribuição dos grupos

Os grupos receberam dieta padrão e dieta hiperlipídica, porém, há um comportamento distinto de cada animal em resposta à dieta ingerida, mesmo intra-grupo (DOBRIAN et al., 2000). Desta forma, ao final do protocolo de exposição às dietas (20ª semana), com o intuito de constituir grupos homogêneos, assegurando que o grupo C (dieta padrão) fosse constituído apenas por animais com características de controle e o grupo Ob (dieta hiperlipídica) apenas por animais com características de obeso, foi construído um intervalo de confiança (IC) de 95%, baseado nas médias de peso corporal dos ratos dos grupos DP e DH. Aplicou-se um ponto de separação (PS) entre os grupos; o qual consiste em um ponto médio entre o limite superior do grupo DP e o limite inferior do grupo DH, conforme Figuras 2A e 2B. A partir deste ponto, foram excluídos do grupo DP animais com peso corporal acima do PS, e os que permaneceram formaram o grupo controle (C). No entanto, do grupo DH os animais com peso corporal acima do PS foram classificados como obesos (Ob), e aqueles que ficaram abaixo deste ponto, foram classificados como resistentes à obesidade (ROb), como ilustra a representação esquemática abaixo, Figura 2C.

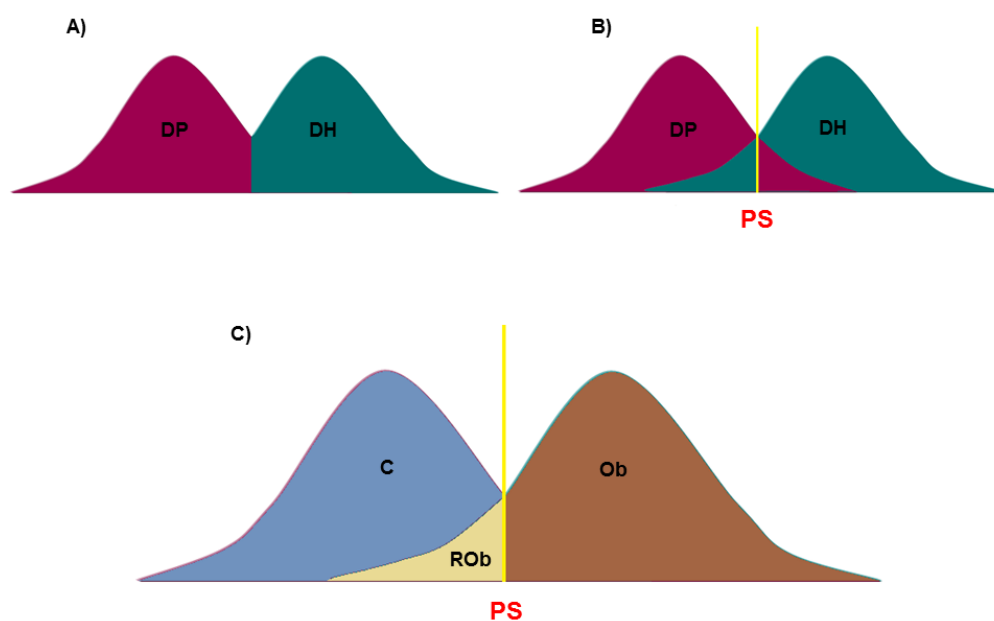


Figura 2. Representação esquemática do critério utilizado para composição dos grupos. **A)** Protocolo de indução à obesidade e exposição à dieta, **B)** Aplicação do ponto de separação (PS) e **C)** Composição dos grupos controle (C), obeso (Ob) e resistente à obesidade (ROb).



3.2.3. - Protocolo de treinamento físico

Após a redefinição dos grupos em C e RO_b, os animais foram submetidos ao protocolo de treinamento físico (TF). Considerando o objetivo do presente estudo, os animais Ob permaneceram no protocolo experimental até a 20ª semana apenas com o intuito de servir como parâmetro de identificação da resistência à obesidade. Desta forma, somente os animais dos grupos C e RO_b foram submetidos ao protocolo de TF que perdurou 12 semanas (20ª a 32ª semana), constituindo, então, os grupos C e RO_b com presença ou ausência de treinamento físico (C= 12; CEx= 14; RO_b= 9 e RO_bEx= 10).

O TF aeróbio foi adaptado de Mostarda et al. (2012) e envolveu um programa de corrida realizado em esteira rolante específica para ratos (Insight Instrumentos – Ribeirão Preto, SP, Brasil), 5 vezes por semana durante 12 semanas com volumes de treino que evoluíram de 15 à 60 min/sessão e progressão de intensidade de 55 à 70% do teste de velocidade máxima (TVM) (Quadro 2).

Dentro deste contexto, os ratos foram submetidos a um período de adaptação à esteira em baixa intensidade com velocidade de 5 m/min nos dois primeiros dias, 10 m/min nos dois dias posteriores e 15 m/min no último dia, da 1ª semana. Posteriormente, os animais realizaram teste de esforço, em esteira, com velocidade inicial de 9 m/min. A cada 3 minutos a velocidade foi aumentada em 3 m/min até o animal atingir a exaustão (MORAES-SILVA et al., 2010; RODRIGUES et al., 2007). O critério de exaustão adotado na avaliação no ergômetro foi a não manutenção da corrida na velocidade proposta por 30 segundos. A fim de ajustar as cargas de exercício levando em consideração alguns dos princípios do treinamento físico (princípio da sobrecarga e da adaptação) (KENNEY; WILMORE; COSTIL, 2013), o teste de esforço foi repetido a cada duas semanas até a 7ª semana.



Quadro 2. Protocolo de treinamento físico

Semanas	Progressão de Treinamento		
	Volume	Sessões de Treino	Intensidade (VMC)
1		TESTE DE ESFORÇO	
1	15 minutos	5 dias/semana	55%
2	30 minutos	5 dias/semana	55%
3		TESTE DE ESFORÇO	
3	30 minutos	5 dias/semana	60%
4	45 minutos	5 dias/semana	60%
5		TESTE DE ESFORÇO	
5	45 minutos	5 dias/semana	65%
6	60 minutos	5 dias/semana	65%
7		TESTE DE ESFORÇO	
7 a 12	60 minutos	5 dias/semana	70%

VMC: Velocidade máxima de corrida obtida no teste de esforço.

3.3. - Avaliação nutricional

3.3.1. – Perfil nutricional

O perfil nutricional foi determinado pela análise do peso e gordura corporal e índice de adiposidade. O peso corporal dos animais foi aferido semanalmente, utilizando balança digital Mettler® modelo Spider2 (Toledo do Brasil Indústria de Balanças Ltda, São Bernardo do Campo, São Paulo, Brasil).

A quantidade de gordura corporal foi determinada pela somatória dos depósitos de gordura epididimal, retroperitoneal e visceral. O índice de adiposidade foi calculado, dividindo-se a gordura corporal pelo peso corporal final, multiplicado por 100 (TAYLOR; PHILLIPS, 1996).

3.3.1.1. – Ingestão alimentar, ingestão calórica e eficiência alimentar

Os animais receberam 50g de ração e após 24 horas a quantidade não ingerida foi mensurada diariamente. A ingestão alimentar (IA) foi determinada pela seguinte fórmula (BORST; CONOVER, 2005):



IA = 50g de ração - quantidade não ingerida

A ingestão calórica (ICal) foi calculada pela seguinte fórmula (BORST; CONOVER, 2005):

$$\text{ICal} = \text{IA semanal (g)} \times \text{valor calórico de cada dieta (kcal)}$$

Com a finalidade de analisar a capacidade do animal em converter a energia alimentar consumida em peso corporal, foi calculada a eficiência alimentar (EA) (DINIZ et al., 2004; RELLING et al., 2006):

$$\text{EA} = \frac{\text{ganho total de peso (g)}}{\text{energia total ingerida (Kcal)}} \times 100$$

3.3.2. - Curva glicêmica

As coletas de sangue, na artéria caudal, foram realizadas na condição basal após período de jejum de 6 horas e posteriormente à administração intraperitoneal de glicose 25% (Sigma-Aldrich,[®] St Louis, MO, USA), equivalente a 2g/kg. As amostras sanguíneas foram coletadas nos momentos 0, considerado condição basal, e após 15, 30, 60, 90 e 120 minutos da administração da glicose. A mensuração dos níveis glicêmicos foi realizada com glicosímetro portátil Accu-ChekGo Kit (Roche Diagnostic Brazil Ltda, São Paulo, Brasil). A tolerância à glicose nestes animais foi avaliada pelo perfil da área glicêmica (AKIYAMA et al., 1996).

3.4. – Eutanásia

Os animais foram anestesiados com cloridrato de ketamina (50 mg/kg/ip; Dopalen[®], Sespo Indústria e Comércio Ltda - Divisão Vetbrands, Jacareí, São Paulo, Brasil) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg/ip; Anasedan[®], Sespo Indústria e Comércio Ltda - Divisão Vetbrands, Jacareí, São Paulo, Brasil) e eutanasiados por decapitação.



3.5. - Parâmetros analisados

As alterações no perfil cardiovascular, metabólico e hormonal, como hipertensão arterial sistêmica, intolerância à glicose, resistência sistêmica à insulina, dislipidemias, hiperglicemia, hiperinsulinemia e hiperleptinemia, que podem estar frequentemente associadas à obesidade (DOBRIAN et al., 2000; LEVIN et al., 2000), foram avaliadas nos grupos.

3.5.1. - Pressão arterial sistêmica

A pressão arterial sistólica (PAS) foi aferida indiretamente a partir de pletismografia de cauda, utilizando-se eletroesfigmomanometro Narco Bio-System®, modelo 709-0610 (International Biomedical, Inc, USA); este método não permite avaliar a pressão arterial diastólica. Com a finalidade de produzir vasodilatação da artéria caudal, os ratos foram previamente aquecidos, à temperatura de 40°C por 5 minutos, em uma caixa de madeira (50 x 40 cm) forrada com maravalha de *Pinus* autoclavada. Após o aquecimento, foi acoplado o sensor e o manguito em torno da cauda do animal. O manguito foi insuflado até atingir pressão de 200 mmHg e, posteriormente, desinsuflado. As pulsações arteriais foram registradas em polígrafo Gould RS 3200 (Gould Instrumenta Valley View, Ohio, USA).

3.5.2. - Perfil glicêmico e lipídico

Para análise do perfil glicêmico e lipídico, os ratos foram colocados em jejum por 12 a 15 horas. No momento da eutanásia, as amostras de sangue foram coletadas em tubos *Falcon*, centrifugadas a 3000rpm por 10 minutos (Eppendorf® Centrifuge 5804-R, Hamburg, Germany) e armazenadas em freezer à -80°C (Thermo Fisher Scientific LLC, Asheville, NC, USA). As concentrações séricas de glicose, triacilglicerol e colesterol total, foram determinadas utilizando-se *kits* específicos (Bioclin Bioquímica®, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil e Synermed do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil) e analisadas pelo analisador bioquímico automatizado BS-200 (Mindray do Brasil - Comércio e Distribuição de Equipamentos Médicos Ltda, São Paulo, Brasil).



3.5.3. - Concentração plasmática de insulina e leptina

As concentrações hormonais foram determinadas pelo método de ELISA utilizando-se *kits* específicos (Linco Research Inc, St. Louis, MO, USA). A leitura foi realizada com auxílio de leitor de micro-placa (Biochrom EZ Read 800 Plus, Holliston, MA, USA).

3.5.4. - Índice de resistência sistêmica à insulina

O índice HOMA-IR (*homeostatic model assessment*), baseado nas concentrações séricas de glicose e insulina de jejum, foi calculado usando a seguinte fórmula: concentração de insulina ($\mu\text{U/mL}$) multiplicado pelos níveis glicêmicos (mM/L) dividido por 22,5 (MATTHEWS et al., 1985).

3.6. – Músculo papilar isolado

A técnica que utiliza o músculo papilar isolado do ventrículo esquerdo (VE) permite avaliar a função mecânica do miocárdio *in vitro*. Este método detecta alterações precoces na contração e relaxamento do músculo cardíaco, (CICOGNA et al., 2000) independente das variações da pós-carga, pré-carga, frequência cardíaca, influência hormonal e substrato energético, as quais são de difícil obtenção na avaliação do coração *in vivo*. Além disso, como a adaptação do organismo à resistência à obesidade pode causar efeitos indiretos no coração, o estudo com músculo papilar isolado tem a vantagem de possibilitar a análise direta da função miocárdica, conforme a técnica descrita abaixo.

Após a eutanásia, os corações foram rapidamente removidos e colocados em solução de Krebs-Henseleit (KREBS; HENSELEIT, 1932) com a seguinte composição em mM: 1185 NaCl ; 4,69 KCl ; 2,5 CaCl_2 ; 1,16 MgSO_4 ; 1,18 KH_2PO_4 ; 5,50 glicose e 24,88 NaCO_3 , mantidos a temperatura de 28°C , previamente oxigenada durante 10 minutos com 95% de oxigênio (O_2) e 5% de dióxido de carbono (CO_2). Após permanecerem aproximadamente 1 minuto na solução, os corações foram retirados e o ventrículo direito dissecado com a finalidade de expor o septo interventricular ; este foi dividido para permitir a exposição adequada dos dois músculos papilares, anterior e posterior do VE. Os músculos papilares foram cuidadosamente dissecados, mantendo-se em suas extremidades segmentos da parede ventricular. Esses fragmentos foram



presos a anéis de aço inoxidável com diâmetro interno de 3,8 a 4,2 mm; a fixação dos anéis nestes fragmentos tem como finalidade evitar lesão da extremidade dos músculos papilares. Após terem suas extremidades presas aos anéis, os músculos papilares foram rapidamente transferidos para a cuba de vidro contendo a mesma solução de Krebs-Henseleit descrita acima, continuamente oxigenada com 95% de O₂, 5% de CO₂ e mantida à temperatura de 28°C, por meio do uso de banho circulante (Refrigerating/Heating -20°C to 150°C, PolyScience Division of Preston Industries, Inc., Niles, IL, USA). O músculo papilar foi posicionado verticalmente e sua extremidade inferior acoplada a um fio de aço inoxidável (0,38mm de diâmetro), conectado a um transdutor de força (Grass FT03 Force Displacement Transducer, GRASS Technologies, An Astro-Med, Inc. Product Group, West Warwick, RI, USA). O fio de aço atravessa uma fenda, preenchida por mercúrio, existente no assoalho da cuba de vidro. A porção superior tendinosa do músculo papilar foi conectada a outro fio de aço, semelhante ao anterior, ligado à extremidade do braço longo de uma alavanca isotônica de metal. Nessa extremidade existia um micrômetro (L.S. Starrett. Co. Athol. Mass. N°463, USA) que controlava a extensão dos movimentos da alavanca, permitindo ajustar o comprimento de repouso do músculo papilar. Na extremidade do braço curto da alavanca foi suspenso por mais um fio de aço, semelhante aos anteriores, um peso de 5,0 g denominado **pré-carga**, que tinha por finalidade promover o estiramento inicial do músculo papilar. A alavanca era constituída de alumínio ou bronze, rígida e leve, sendo a razão entre os braços longo e curto de 4:1.

Os músculos papilares foram estimulados 12 vezes por minuto (0,2Hz) por meio de eletrodos de platina tipo agulha (Grass E8, GRASS Technologies, An Astro-Med, Inc. Product Group, West Warwick, RI, USA), posicionados paralelamente ao eixo longitudinal dos músculos. Os eletrodos foram acoplados ao estimulador elétrico (Grass S48, GRASS Technologies, Na Astro-Med, Inc. Product Group, West Warwick, RI, USA) que emitia estímulos em onda quadrada de mili-segundos. A voltagem de estímulo utilizada foi de 12 a 15 volts, aproximadamente, 10% acima do valor mínimo necessário para provocar resposta mecânica máxima do músculo. O pH da solução foi entre 7,38 a 7,42 e a pressão parcial de oxigênio da solução foi mantida entre 550 a 600 mmHg.

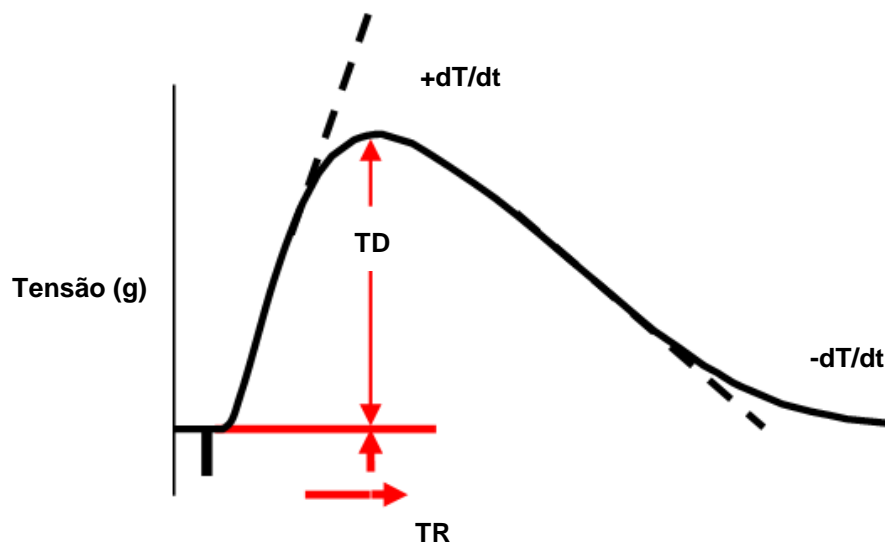


Após um período de 60 minutos, durante os quais os músculos contraíram contra a pré-carga sem desenvolverem força, contração isotônica, foi colocada uma carga adicional de 50 g, denominada **pós-carga**, na extremidade do braço curto da alavanca. A carga total, pós-carga acrescida à pré-carga, impedia que os músculos encurtassem, de modo que os mesmos desenvolvessem somente força sem movimentação da alavanca, contração isométrica. O excessivo estiramento muscular que poderia ser causado pela adição da pós-carga foi evitado pelo micrômetro que impedia a movimentação da alavanca. Após a estabilização do músculo em contração isométrica, este foi progressivamente estirado, por meio do micrômetro, até a força desenvolvida atingir seu valor máximo. O comprimento de estiramento da fibra muscular associado à força ou tensão máxima desenvolvida, em contração isométrica, denominou-se $L_{máx}$. Após atingir o $L_{máx}$, o músculo foi novamente colocado em contração isotônica durante 5 minutos. A seguir, o músculo papilar foi recolocado em contração isométrica para determinação final do $L_{máx}$. O registro das variáveis foi iniciado após verificar-se que o músculo permaneceu estável em contração isométrica durante 15 minutos.

3.6.1. – Parâmetros funcionais

Os seguintes parâmetros mecânicos foram analisados de uma curva obtida em contração isométrica : tensão máxima desenvolvida (TD , g/mm^2), tensão de repouso (TR , g/mm^2), velocidade máxima de variação da tensão desenvolvida ($+dT/dt$, $g/mm^2/s$) e velocidade máxima de variação de decréscimo da tensão desenvolvida ($-dT/dt$, $g/mm^2/s$). A curva de contração isométrica obtida durante os experimentos está representada abaixo.





Representação esquemática da curva de contração isométrica

As contrações isométricas foram registradas em um sistema de aquisição de dados computadorizado (AcqKnowledge[®] MP100, Biopac Systems, Inc, Santa Barbara, CA, USA). A análise das curvas permitiu determinar os valores dos parâmetros mecânicos. Os valores da TD, TR, $+dT/dt$ e $-dT/dt$ foram divididos pela área seccional do músculo papilar. Este processo de normalização permitiu comparar o desempenho de músculos de diferentes tamanhos. Os dados obtidos são apresentados em valores absolutos (g/mm^2).

3.6.2. – Protocolo funcional

O desempenho mecânico dos músculos papilares em contração isométrica foi analisada sob condição basal e após diferentes manobras inotrópicas e lusitrópicas. Esse processo foi utilizado com a finalidade de identificar alterações da contração e relaxamento que poderiam não ser observadas em condições basais. Além disso, as mesmas poderiam auxiliar no entendimento dos possíveis mecanismos relacionados com alterações da função mecânica do miocárdio. As manobras mais frequentemente utilizadas são: potenciação pós-pausa e variação da concentração de cálcio extracelular, que permitem verificar a participação do trânsito de Ca^{+2} intracelular na patogênese da disfunção do miocárdio.



3.6.2.1. – Protocolo funcional em condição basal

A obtenção dos dados em condição basal foi realizada com concentração de cálcio de 2,5 mM na solução de Krebs-Henseleit.

3.6.2.1.1. – Manobras inotrópicas e lusitrópicas

As seguintes manobras inotrópicas e lusitrópicas miocárdicas com efeitos positivos e negativos foram realizadas:

3.6.2.1.1.1. – Potenciação pós-pausa

A potenciação pós-pausa (PPP) é um instrumento utilizado para estudar a função de liberação e armazenamento de cálcio pelo retículo sarcoplásmico (URTHALER, 1988; YAMATO et al., 2001). Além disso, esta manobra permite analisar indiretamente o trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$. A relação entre PPP e a função miocárdica foi realizada com concentração de cálcio 0,5 mM na solução de Krebs-Henseleit e após períodos de repouso de 10, 30, 60 e 90 segundos com intervalos de 5 minutos entre cada pausa e retomada do estímulo. Os períodos crescentes tiveram como finalidade disponibilizar maiores quantidades de cálcio citosólico e, portanto, identificar a magnitude do desempenho do músculo cardíaco.

3.6.2.1.1.2. – Elevação da concentração extracelular de cálcio

A elevação da concentração de cálcio intracelular acarreta aumento do fluxo desse íon por meio dos canais lentos de Ca^{+2} e pela troca $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$, o que permite, assim como o PPP, avaliar os mecanismos relacionados com o transporte de cálcio intracelular e a função miocárdica (DAVID et al., 2001). A elevação da concentração de cálcio na solução de Krebs-Henseleit foi realizada com aumentos sequenciais de Ca^{+2} de 0,5 para 1,0, 1,5, 2,0 e 2,5 mM com intervalos de 5 minutos entre cada concentração.

Após o término das manobras de avaliação mecânica do músculo papilar, os mesmos foram retirados da preparação e usados para a avaliação da área seccional. Os parâmetros morfológicos utilizados para caracterizar os músculos papilares foram: comprimento (mm), peso (mg) e área seccional (mm^2). O comprimento in vitro, ($L_{\text{máx}}$) foi medido



com auxílio de um catetômetro Gartner (Gartner Scientific Corporation, Chicago, USA). A porção muscular entre os anéis de aço foi cortada, submetida à secagem com papel filtro e pesada. Considerando-se que o músculo papilar tem forma cilíndrica, uniforme e peso específico aproximadamente unitário, a área seccional foi calculada dividindo-se o peso pelo comprimento determinado em $L_{m\acute{a}x}$.

Os músculos papilares dissecados, que apresentaram área seccional entre 0,5 e 1,7 mm², foram utilizados no experimento, sendo excluídos aqueles que apresentaram área seccional maior que o valor superior ou menor que o valor inferior. Além disso, os músculos papilares que apresentaram comportamento funcional fora do padrão de normalidade foram excluídos do estudo. O desempenho mecânico foi considerado inadequado quando os valores das variáveis obtidas em contração isométrica apresentaram afastamento superior a dois desvios padrão da média, ou seja, cujo escore em valor absoluto foi superior a 1,96.

3.7. - Caracterização cardíaca *post mortem*

3.7.1. - Estrutura do coração

A análise estrutural macroscópica *post mortem* permite identificar a presença de remodelação cardíaca atrial e ventricular (MATSUBARA et al., 2000). A remodelação macroscópica, que identifica a presença ou ausência de hipertrofia, foi determinada pela análise dos seguintes parâmetros: determinação da área seccional transversa do miócito (AST) e mensuração da fração de colágeno intersticial; bem como, pelo peso total do coração, dos átrios (AT), dos ventrículos esquerdo (VE) e direito (VD). A tíbia foi removida e limpa dos tecidos moles circundantes e mensurado seu comprimento a partir de um paquímetro (ZAAS Precision - Amatools Comercial e Importadora Ltda), para posterior utilização como critério de normalização por meio da relação entre as câmaras cardíacas e o comprimento da tíbia.

3.7.2. - Área seccional transversa (AST)

A análise da área seccional transversa do miócito foi realizada utilizando amostras do ventrículo esquerdo (VE). Após toracotomia mediana, o



coração foi rapidamente removido e amostras da parede anterior do VE foram retiradas a 6 mm do ápice. Os fragmentos colocados em solução de formol a 10% por 24h (CARROL et al., 2006). A seguir, o tecido miocárdico foi lavado em água corrente por 24h, transferido para solução de etanol 70% e incluso em bloco de parafina. Os cortes histológicos de 4µm de espessura foram corados em lâmina com solução de hematoxilina-eosina (HE) e projetados com aumento de 40 vezes com o auxílio de microscópio, (Leica Mikroschopie & System GmbH, Wetzlar, Germany), acoplado a câmera de vídeo, que envia imagens digitais a um computador dotado de programa de análise de imagens (Image Pro-plus, Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, USA). Para cálculo das áreas seccionais dos miócitos foram mensuradas 50 a 70 células por VE. Os miócitos analisados, localizados na camada subendocárdica da parede muscular, devem estar seccionados transversalmente e apresentar forma arredondada com núcleo visível no centro da célula (MATSUBARA et al., 2000). As áreas seccionais transversas dos miócitos (AST; μm^2) foram utilizadas como indicador do tamanho celular, caracterizando presença ou ausência de hipertrofia cardíaca.

3.7.3. - Colágeno intersticial miocárdico

A determinação da fração de colágeno (%) foi realizada por meio da técnica de *Picrosirius Red* (CALVI et al., 2012). Nesta metodologia foi mensurado o colágeno intersticial, sendo excluído o colágeno perivascular. Os fragmentos do ventrículo esquerdo foram lavados em água corrente por 24 horas, transferidos para etanol 70% diluído em água, inclusos em blocos de parafina e corados com *Picrosirius Red*. A quantificação da fração do colágeno intersticial foi realizada utilizando-se 30 a 40 campos por fragmento. Os componentes do tecido foram identificados de acordo com o nível de coloração: vermelho, fibras colágenas; amarelo, miócitos e branco, espaço intersticial.

Os cortes histológicos, para análise da fração de colágeno intersticial, foram ampliados 40 vezes com o auxílio de microscópio (Leica DM4000 B LED, modelo B LED, LEICA Mikroskopie & System GmbH Wetzlar, Germany) acoplado a uma câmera de vídeo (LEICA DFC295, Leica Microsystems Ltd. Germany), que envia imagens digitais a um computador dotado de programa de análises (Leica Application Suite, Version 4.2.0).



3.7.4. - Determinação do teor de água nos tecidos cardíaco, pulmonar e hepático

A retenção hídrica pode caracterizar sinais de insuficiência cardíaca. Deste modo, a avaliação do teor de água tecidual foi realizada nas amostras de VE, VD, AT, pulmão e fígado. Após a remoção do tecido a ser examinado, foi aferido o peso *in natura*. Em seguida, as amostras foram submetidas à secagem em estufa sob temperatura de $55 \pm 5^{\circ}\text{C}$, por período de 48 horas. A determinação do teor de água foi expressa em valores relativos e calculada pela seguinte fórmula: $[(\text{PN}-\text{PS})/\text{PN}] \times 100\%$, onde PN representa o peso *in natura* e o PSec o peso seco.

3.8. - Análise estatística

Os dados foram exibidos por meio de medidas descritivas de posição e variabilidade e submetidos à análise de variância (ANOVA) para amostras independentes (uma via ou duas vias), quando apropriado.

As comparações entre os grupos no final do experimento, após as 12 semanas de treinamento físico, foram realizadas por ANOVA para o modelo de dois fatores e complementada com os testes de comparações múltiplas de Bonferroni (JOHNSON; WICHERN, 2008).

A comparação da evolução do peso corporal, perfil glicêmico, elevação da concentração de cálcio e potenciação pós-pausa foi realizada por ANOVA no modelo de medidas repetidas para esquema de dois fatores independentes e complementada com o teste de comparações múltiplas de Bonferroni (JOHNSON; WICHERN, 2008). O nível de significância considerado para todas as variáveis foi de 5%.

4 RESULTADOS

Os resultados estão apresentados considerando os períodos de protocolo experimental, conforme descrito na metodologia (pág. 8).



4.1. – Caracterização do momento inicial da obesidade

O peso corporal dos animais foi semelhante nas 4 primeiras semanas do protocolo experimental; entretanto, na 5ª semana o peso corporal dos animais DH foi significativamente maior que os DP, caracterizando o *momento inicial da obesidade* (Figura 3).

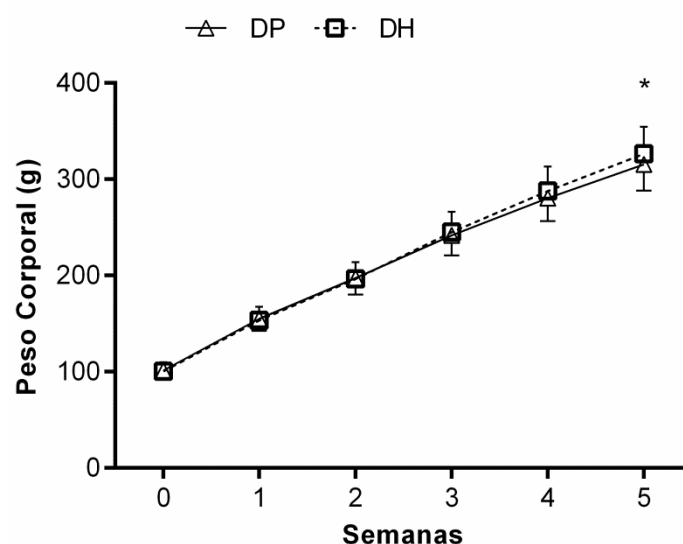


Figura 3. Evolução do peso corporal durante o período de indução à obesidade de 5 semanas. Grupos dieta padrão (DP, n=40) e dieta hiperlipídica (DH, n=40) insaturada. Dados expressos em média \pm desvio padrão. * $p < 0,05$ vs C. ANOVA duas vias para medidas repetidas, complementada com teste *post-hoc* de Bonferroni.

4.2. – Caracterização da resistência à obesidade

Os animais foram expostos à dieta hiperlipídica (DH) e dieta padrão (DP) até a 20ª semana. Neste momento aplicou-se o ponto de separação com a finalidade de excluir falsos controles do grupo DP e identificar os animais ROb dos Ob no grupo DH, conforme previamente descrito na sessão material e métodos (pág.9). A redefinição dos grupos indicou que dentro do grupo exposto à dieta hiperlipídica, 19 animais caracterizaram-se como resistentes à obesidade e 21 obesos. Foram excluídos do grupo DP 13 animais que apresentaram peso corporal acima do PS, os demais constituíram o grupo C. Desta forma, evidenciaram-se três grupos distintos C (n=27), Ob (n=21) e ROb (n=19).



A Figura 4 ilustra a evolução do peso corporal dos animais após aplicação do critério de composição dos grupos. A partir da 3ª até a 20ª semana, os animais do grupo Ob apresentaram valores elevados de peso corporal em relação aos animais C e ROb, os quais não diferiram entre si.

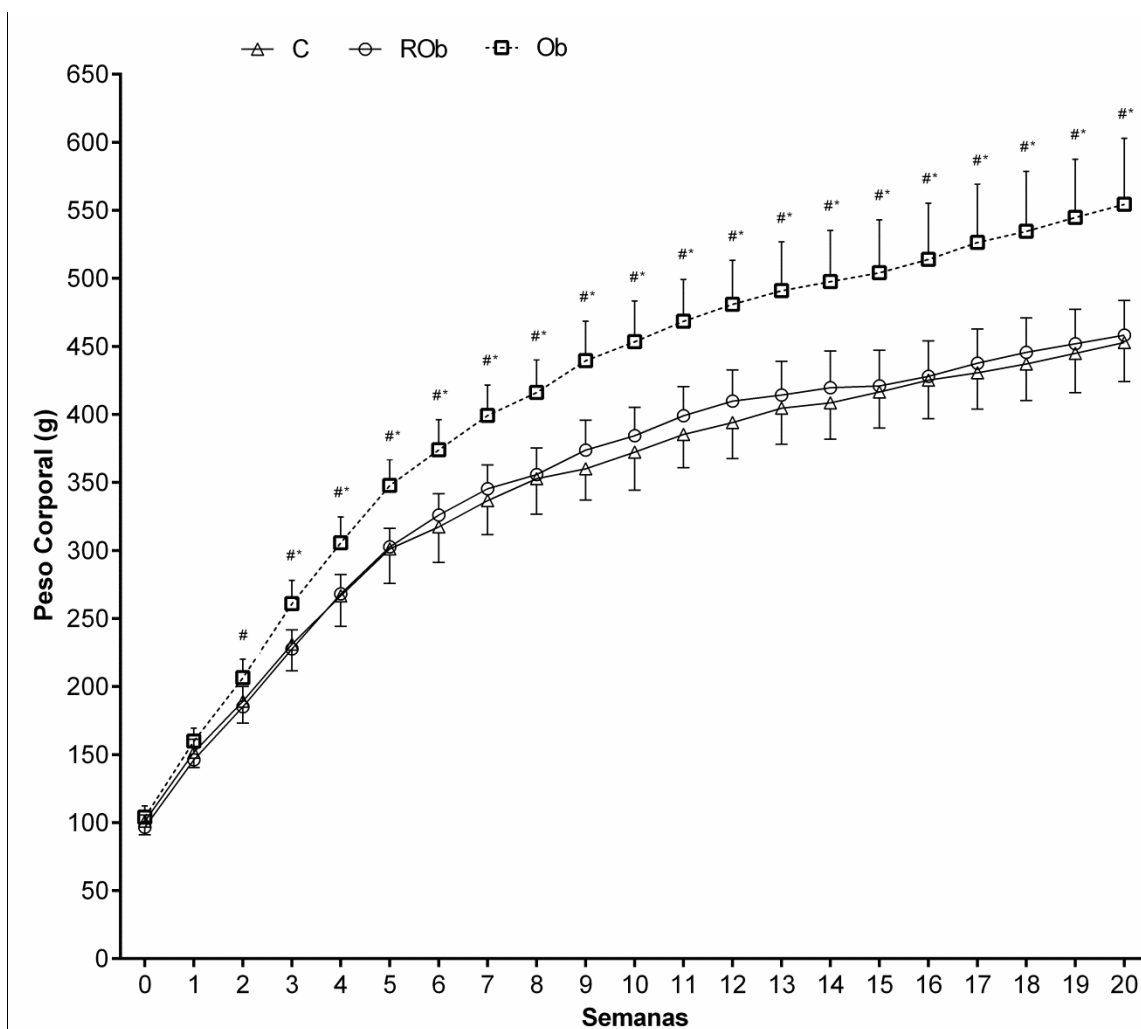


Figura 4. Evolução do peso corporal durante protocolo de indução à obesidade e exposição à dieta, até a 20ª semana. Grupos controle (C, n=27), resistente à obesidade (ROb, n=19) e obeso (Ob, n=21). Dados expressos em média \pm desvio padrão. $p < 0,05$; # (ROb vs Ob); * (Ob vs C). ANOVA duas vias para medidas repetidas, complementada com o teste *post-hoc* de Bonferroni.



A Tabela 1 ilustra as características nutricionais dos grupos durante o protocolo de indução e exposição à obesidade após 20 semanas de tratamento. O ganho de peso corporal do grupo Ob foi maior quando comparado aos grupos C e ROOb, os quais foram semelhantes. A ingestão alimentar diária do grupo Ob foi maior que do ROOb, não houve diferença entre os grupos C e Ob. A ingestão calórica diária do grupo Ob foi maior que dos demais grupos, de modo que os animais ROOb apresentaram valores intermediários, diferindo significativamente dos grupos C e Ob. A eficiência alimentar do grupo ROOb foi significativamente diminuída em relação aos demais grupos.

Tabela 1. Características nutricionais durante protocolo de indução à obesidade e exposição à dieta.

Variáveis	Grupos		
	C (n=27)	ROOb (n=19)	Ob (n=21)
Ganho de peso (g)	351 ± 28,0	362 ± 26,3	450 ± 46,9* [#]
Ingestão alimentar (g/dia)	22,3 ± 1,39	20,9 ± 2,79	22,8 ± 0,38 [#]
Ingestão calórica (Kcal/dia)	65,9 ± 4,12	76,3 ± 10,2 ^{&}	83,1 ± 6,36* [#]
Eficiência alimentar (%)	3,81 ± 0,23	3,42 ± 0,36 ^{&}	3,87 ± 0,20 [#]

Protocolo de indução e exposição à obesidade após 20 semanas de tratamento. C: controle; ROOb: resistente à obesidade e Ob: obeso. Dados expressos em média ± desvio padrão. p<0,05; [&](ROOb vs C); * (Ob vs C); [#](ROOb vs Ob). Análise de Variância ANOVA *uma via* para amostras independentes

Finalizada a 20ª semana de tratamento, os animais foram redistribuídos quanto à presença ou ausência de treinamento físico. Desta forma, a Figura 5 ilustra o comportamento da evolução do peso corporal dos grupos durante todo protocolo experimental (semana inicial à 32ª semana), apenas sob influência da dieta, caracterizando a resistência à obesidade. A partir da 4ª até a 32ª semana os animais do grupo Ob apresentaram maior peso corporal em relação aos animais dos grupos C e ROOb, os quais foram semelhantes.



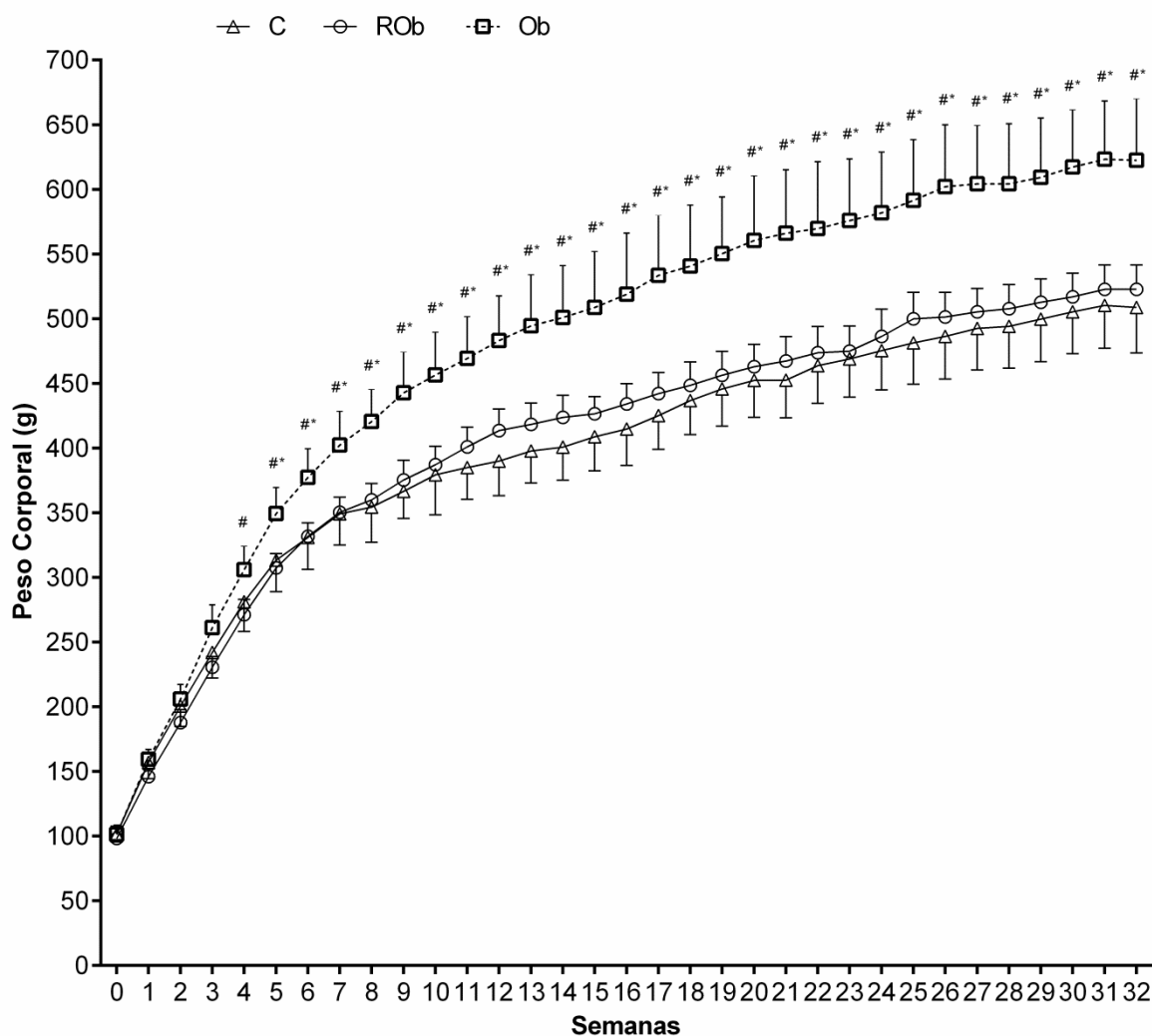


Figura 5. Evolução do peso corporal durante protocolo de indução à obesidade e exposição à dieta durante 32 semanas. Grupos controle (C, n=27), resistente à obesidade (ROb, n=19) e obeso (Ob, n=21). Dados expressos em média \pm desvio padrão. $p < 0,05$; * (Ob vs C); # (ROb vs Ob) e & (ROb vs C). ANOVA duas vias para medidas repetidas, complementada com o teste *post-hoc* de Bonferroni.

A Tabela 2 mostra a caracterização da resistência à obesidade ao término do protocolo experimental. Os grupos não apresentaram diferença para o peso corporal inicial. O peso corporal final, o ganho de peso, os depósitos de gordura retroperitoneal, visceral e gordura total, bem como, o índice de adiposidade dos grupos C e ROb foram semelhantes, de modo que os valores do grupo Ob foram aumentados em relação aos demais grupos. A gordura epididimal foi maior no grupo Ob somente em relação ao C. A ingestão alimentar diária foi menor no grupo ROb diferindo aos demais grupos. Porém, a ingestão calórica diária do grupo ROb foi diminuída quando comparada ao Ob, em contrapartida, foi maior que do grupo C, apresentando valores



intermediários. A eficiência alimentar do grupo ROb foi significativamente menor que dos grupos C e Ob, os quais não apresentaram diferença estatística entre si.

Os dados dos animais do grupo Ob foram mantidos na Figura 5 e Tabela 2 somente para evidenciar os animais ROb, uma vez, que estes últimos receberam a mesma dieta dos animais que se tornaram obesos, porém não apresentaram características similares.

Tabela 2. Caracterização da resistência à obesidade ao término do protocolo experimental.

Variáveis	Grupos		
	C (n=12)	ROb (n=9)	Ob (n=10)
PCI (g)	102 ± 6,19	98,3 ± 9,27	101 ± 6,90
PCF (g)	509 ± 35,4	523 ± 18,8	623 ± 47,8 ^{*#}
Ganho de peso (g)	407 ± 35,4	424 ± 21,1	522 ± 48,6 ^{*#}
Gordura Epididimal (g)	10,1 ± 3,79	13,0 ± 3,78	14,6 ± 3,23 [*]
Gordura Retroperitoneal (g)	15,6 ± 4,13	17,8 ± 5,45	31,0 ± 5,76 ^{*#}
Gordura Visceral (g)	6,91 ± 1,74	7,03 ± 2,12	12,0 ± 3,13 ^{*#}
Somatório dos depósitos de gordura (g)	32,6 ± 9,27	37,8 ± 9,92	57,5 ± 10,6 ^{*#}
Índice de adiposidade (%)	6,35 ± 1,52	7,22 ± 1,79	9,19 ± 1,10 ^{*#}
Ingestão alimentar (g/dia)	22,5 ± 1,37	20,4 ± 2,48 ^{&}	23,1 ± 1,71 [#]
Ingestão calórica (Kcal/dia)	66,3 ± 4,03	74,5 ± 9,07 ^{&}	84,2 ± 6,25 ^{*#}
Eficiência alimentar (%)	2,75 ± 0,14	2,38 ± 0,16 ^{&}	2,71 ± 0,13 [#]

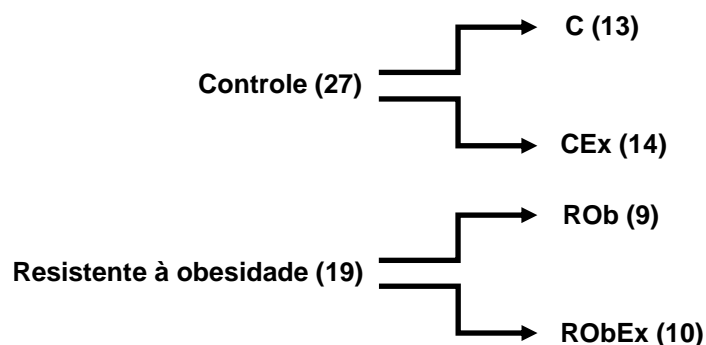
PCI: peso corporal inicial da semana 0; PCF: peso corporal final na semana 32. C: controle; ROb: resistente à obesidade e Ob: obeso. Dados expressos em média ± desvio-padrão. p<0,05; &(ROb vs C); *(Ob vs C); #(ROb vs Ob). Análise de Variância ANOVA de *uma via* para amostras independentes

4.3. – Influência do treinamento físico

O grupo Ob foi utilizado no presente estudo apenas para identificação e caracterização da resistência à obesidade; desta forma, os dados dos animais Ob não foram apresentados considerando a influência do treinamento físico



(TF). Os grupos C e ROb foram redistribuídos em dois grupos, quanto a presença ou ausência de treinamento físico.



Representação esquemática da redistribuição dos grupos controle em C (controle) e CEx (controle exercitado) e resistente à obesidade em ROb (resistente à obesidade) e RObEx (resistente à obesidade exercitado).

Ressaltamos que houve perda (morte) de um animal do grupo controle. Deste modo, na segunda etapa do protocolo experimental (21^a à 32^a semana) o estudo foi composto por quatro grupos: controle (C; n=12), controle submetido ao protocolo de treinamento físico (CEx; n=14), resistente à obesidade (ROb; n=9) e resistente à obesidade submetido ao protocolo de treinamento físico (RObEx; n=10).

A Tabela 3 ilustra as características nutricionais dos grupos experimentais C, CEx, ROb e RObEx após 12 semanas de protocolo de exercício que perdurou da 21^a à 32^a semana. A comparação entre os grupos, considerando a dieta, mostra que o peso corporal inicial não apresentou diferença estatística entre os grupos. A ingestão alimentar dos grupos ROb e RObEx foram menores em relação aos grupos C e CEx, respectivamente. A ingestão calórica foi maior apenas no grupo ROb frente ao C. O depósito de gordura epididimal foi maior nos grupos ROb e RObEx em relação aos respectivos grupos controles. Não houve diferença significativa para as demais variáveis sob efeito da dieta.

A Tabela 3 mostra que o TF (CEx e RObEx) não promoveu alterações na ingestão alimentar e calórica entre os grupos. Porém, foi eficiente na diminuição do peso corporal final, do ganho de peso, dos depósitos de gordura retroperitoneal, visceral, epididimal e somatório dos depósitos de gordura, bem



como da eficiência alimentar e do índice de adiposidade em relação aos grupos não exercitados (C e ROb), respectivamente.

Tabela 3. Características nutricionais durante o protocolo de treinamento físico.

Variáveis	Grupos			
	C (n=12)	CEx (n=14)	ROb (n=9)	RObEx (n=10)
Ingestão alimentar (g/dia)	22,5 ± 0,62	22,7 ± 0,57	20,2 ± 0,71*	19,0 ± 0,68 [£]
Ingestão calórica (Kcal/dia)	66,5 ± 2,10	67,0 ± 1,95	73,6 ± 2,43*	69,4 ± 2,30
Eficiência alimentar (%)	0,93 ± 0,10	0,41 ± 0,10 ^{&}	0,90 ± 0,12	0,48 ± 0,11 [#]
PCI (g)	452 ± 8,05	453 ± 7,46	463 ± 9,30	454 ± 8,82
PCF (g)	509 ± 9,25	479 ± 8,56 ^{&}	523 ± 10,68	486 ± 10,1 [#]
Ganho de peso (g)	56,4 ± 6,86	26,5 ± 6,36 ^{&}	59,8 ± 7,93	31,9 ± 7,52 [#]
Gordura epididimal (g)	10,1 ± 0,83	5,84 ± 0,77 ^{&}	13,0 ± 0,96*	9,05 ± 0,91 ^{#£}
Gordura retroperitoneal (g)	15,6 ± 1,28	10,6 ± 1,20 ^{&}	17,8 ± 1,48	11,1 ± 1,40 [#]
Gordura visceral (g)	6,91 ± 0,51	5,13 ± 0,47 ^{&}	7,03 ± 0,58	4,76 ± 0,55 [#]
Somatário dos depósitos de gordura (g)	32,6 ± 2,37	21,5 ± 2,19 ^{&}	37,8 ± 2,73	24,9 ± 2,59 [#]
Índice de adiposidade (%)	6,35 ± 0,42	4,46 ± 0,38 ^{&}	7,22 ± 0,48	5,09 ± 0,45 [#]

PCI: peso corporal inicial na semana 21; PCF: peso corporal final na semana 32. C: controle; CEx: controle exercitado; ROb: resistente à obesidade; RObEx: resistente à obesidade exercitado. Dados expressos em média ± desvio-padrão. p<0,05; *(ROb vs C); [#](RObEx vs ROb); [&](CEx vs C); [£](RObEx vs CEx). Análise de Variância ANOVA *duas vias* para amostras independentes.

A Figura 6 ilustra a evolução do peso dos animais C, CEx, ROb e RObEx da semana inicial até a 32ª semana durante o protocolo de indução à obesidade (5 semanas), exposição à dieta (15 semanas) e de treinamento físico (12 semanas). Considerando o perfil de evolução do peso corporal entre os grupos, o TF promoveu diminuição dos valores entre os grupos resistentes à obesidade (RObEx < ROb) nas semanas 31 e 32. Nos grupos C, o TF acarretou redução de peso corporal apenas na 32ª semana (CEx < C).



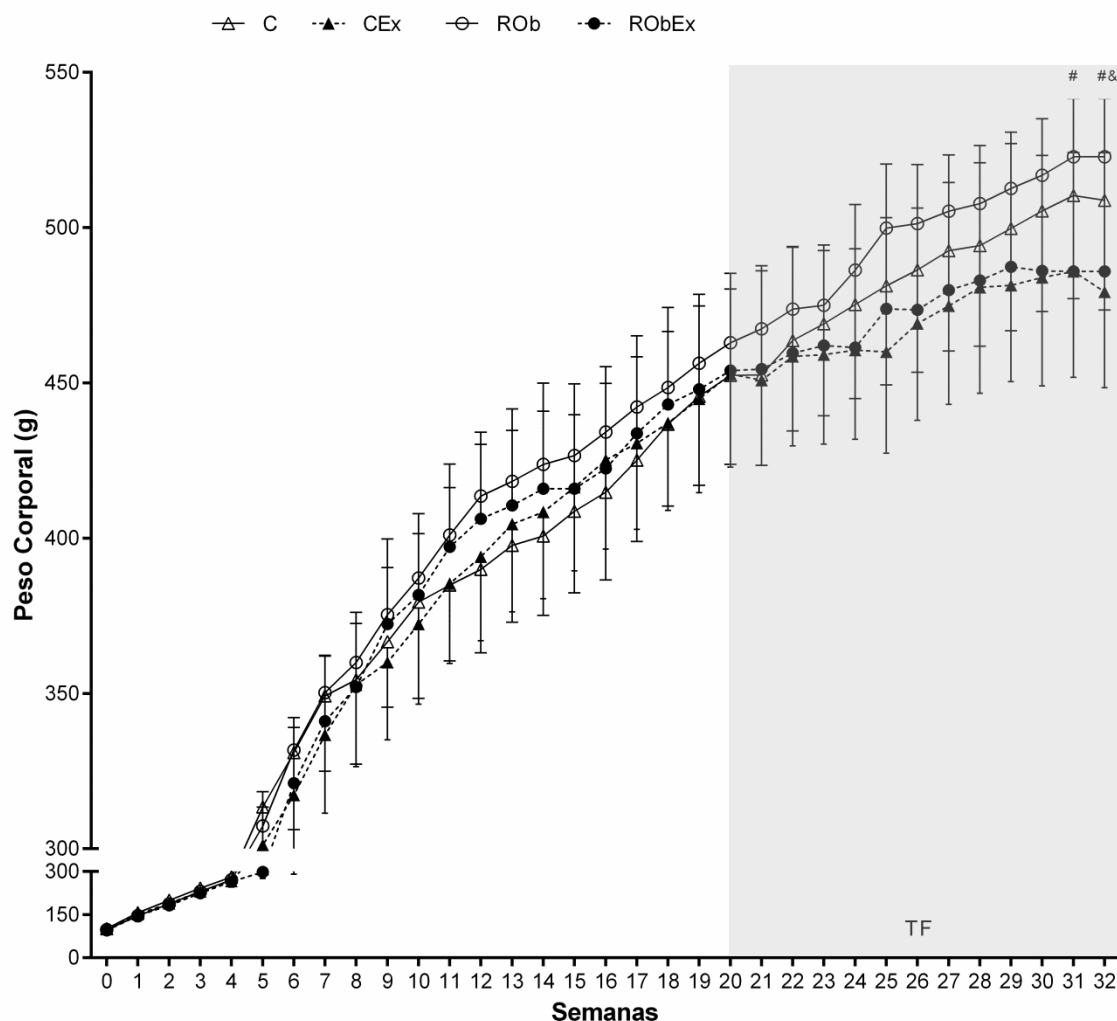


Figura 6. Evolução do peso corporal durante o período de exposição à dieta de 32 semanas. TF: período de treinamento físico. Grupos controle (C, n=12), controle exercitado (CEx, n=14), resistente à obesidade (ROb, n=9) e resistente à obesidade exercitado (RObEx, n=10). Dados expressos em média \pm desvio padrão. $p < 0,05$; * (ROb vs C); # (RObEx vs ROb); & (CEx vs C); £ (RObEx vs CEx). ANOVA duas vias para medidas repetidas, complementada com o teste *post-hoc* de Bonferroni.

A Tabela 4 ilustra as características bioquímicas e a pressão arterial sistólica. A comparação entre os grupos destaca que a dieta hiperlipídica promoveu maiores valores de LDL nos grupos resistentes à obesidade (ROb vs C; RObEx vs CEx). No entanto, a presença do treinamento físico, resultou em diminuição dos níveis de LDL nos grupos exercitados CEx e RObEx quando comparados aos grupos C e ROb, respectivamente. A pressão arterial sistólica do grupo RObEx foi maior que os grupos ROb e CEx. Tanto a dieta, quanto o TF não promoveram alterações nos níveis glicose, colesterol total,



triglicerídeos, proteína, HDL e no lactato, bem como no índice de resistência à insulina (HOMA-IR) entre os grupos.

Tabela 4. Características bioquímicas, hormonais e pressão arterial sistólica.

Variáveis	Grupos			
	C (n=12)	CEx (n=14)	ROb (n=9)	RObEx (n=10)
Colesterol total (mg/dL)	78,4 ± 5,39	76,6 ± 4,99	78,4 ± 6,22	68,5 ± 5,90
HDL (mg/dL)	24,5 ± 1,39	27,1 ± 1,29	26,1 ± 1,61	24,1 ± 1,53
LDL (mg/dL)	10,9 ± 1,34	7,39 ± 1,05 ^{&}	15,2 ± 1,31 [*]	10,8 ± 1,24 ^{#£}
Proteínas totais (mg/dL)	6,21 ± 0,11	5,94 ± 0,10	6,03 ± 0,12	5,70 ± 0,12
Triglicerídeos (mg/dL)	52,5 ± 4,35	59,1 ± 4,03	51,9 ± 5,03	46,8 ± 4,77
Glicose (mg/dL)	144 ± 9,21	146 ± 8,53	161 ± 10,6	144 ± 10,1
PAS (mmHg)	109 ± 3,50	112 ± 3,24	99,5 ± 4,04	125 ± 3,83 ^{#£}
Lactato (mg/dL)	14,7 ± 0,74	14,2 ± 0,69	13,7 ± 0,86	14,2 ± 0,81
HOMA-IR	11,9 ± 1,23	8,57 ± 1,23	7,81 ± 1,41	8,10 ± 1,34

Final do protocolo experimental, após a 32ª semana. C: controle; CEx: controle exercitado; Ob: obeso; ROOb: resistente à obesidade; ROObEx: resistente à obesidade exercitado. HDL: lipoproteína de alta intensidade; LDL: lipoproteína de baixa intensidade; PAS: pressão arterial sistólica. Dados expressos em média ± desvio padrão. p<0,05; ^{*}(ROOb vs C); [#](ROObEx vs ROOb); [&](CEx vs C); [£](ROObEx vs CEx). Análise de Variância ANOVA *duas vias* para amostras independentes.

A Figura 7 ilustra os níveis séricos de insulina e leptina. A análise mostrou que resistência à obesidade e o treinamento físico não promoveram alterações significativas nas concentrações séricas de insulina entre os grupos. No entanto, o TF acarretou menor valor de leptina no grupo CEx em relação ao grupo C, sem diferença estatística entre os grupos ROObEx e ROOb (p=0,06).



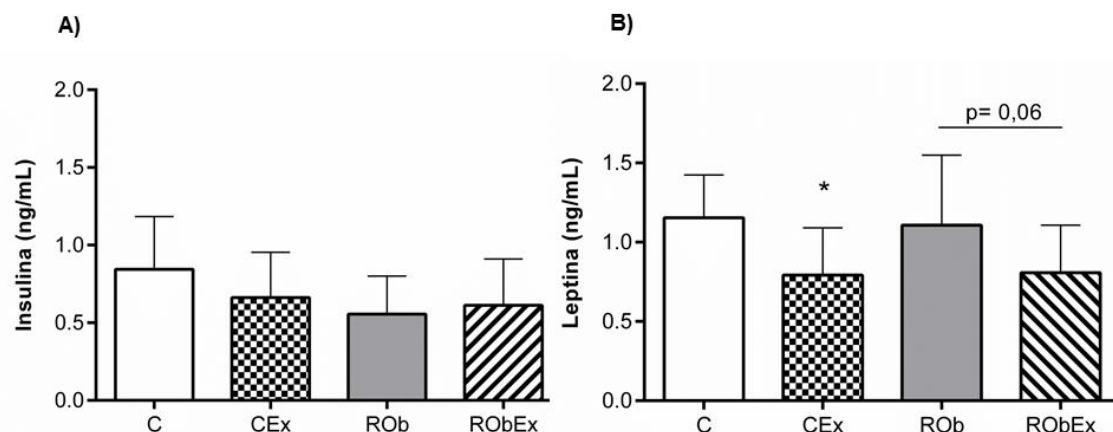


Figura 7. A) Níveis séricos de insulina; **B)** Níveis séricos de leptina. Grupos controle (C, n=12), controle exercitado (CEx, n=14), resistente à obesidade (ROb, n=9) e resistente à obesidade exercitado (RObEx, n=10) após 32 semanas de tratamento. Dados expressos em média \pm desvio padrão. $p < 0,05$; * (ROb vs C). Análise de Variância ANOVA *duas vias* complementada com o teste *post-hoc* de Bonferroni.

A Figura 8 apresenta a área sob a curva (ASC) do perfil glicêmico dos grupos experimentais. Na análise do perfil da ASC, visualiza-se que a dieta hiperlipídica promoveu maiores valores nos grupos resistentes à obesidade (ROb vs C; RObEx vs CEx).

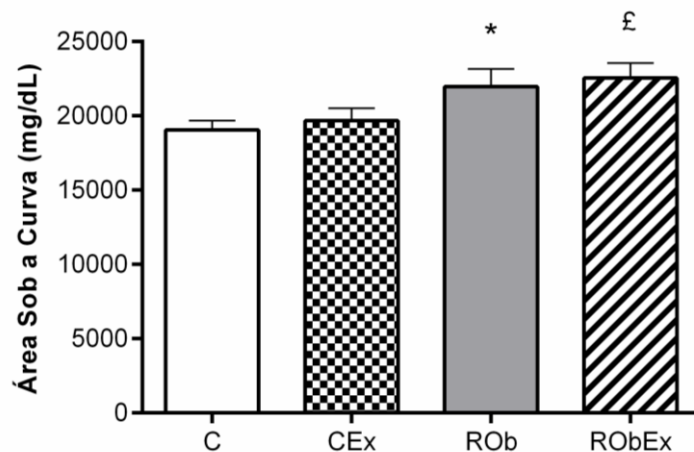


Figura 8. Área sob a curva (ASC) glicêmica. Grupos controle (C, n=12), controle exercitado (CEx, n=14), resistente à obesidade (ROb, n=9) e resistente à obesidade exercitado (RObEx, n=10) após 32 semanas de tratamento. Dados expressos em média \pm desvio-padrão. $p < 0,05$; * (ROb vs C); [#] (RObEx vs ROb); [&] (CEx vs C); [£] (RObEx vs CEx). Análise de Variância ANOVA *duas vias* para medidas repetidas para amostras independentes.



A Tabela 5 ilustra as características morfológicas cardíacas. Os valores do comprimento da tíbia foram semelhantes entre os grupos. O efeito da dieta mostra que o coração, a relação coração/tíbia, o ventrículo esquerdo (VE) e a relação VE/tíbia apresentaram menores valores nos grupos ROb e RObEx em relação ao grupos C e CEx, respectivamente. O átrio e a relação AT/tíbia apresentaram menores valores apenas no grupo RObEx em relação ao CEx. Não houve diferença para as demais variáveis com efeito da dieta. O treinamento físico (CEx vs C; RObEx vs ROb) não promoveu alterações na morfologia cardíaca.

Tabela 5. Características morfológicas do coração após 32 semanas.

Variáveis	Grupos			
	C (n=12)	CEx (n=14)	ROb (n=9)	RObEx (n=10)
Tíbia (cm)	4,37 ± 0,02	4,33 ± 0,02	4,35 ± 0,03	4,35 ± 0,03
VE (g)	0,85 ± 0,02	0,89 ± 0,02	0,69 ± 0,03*	0,68 ± 0,03 [£]
VD (g)	0,22 ± 0,097	0,22 ± 0,009	0,22 ± 0,011	0,22 ± 0,011
AT (g)	0,10 ± 0,004	0,10 ± 0,003	0,09 ± 0,004	0,09 ± 0,004 [£]
Coração (g)	1,17 ± 0,03	1,22 ± 0,03	1,00 ± 0,03*	0,99 ± 0,03 [£]
VE/ tíbia (g/cm)	0,19 ± 0,005	0,21 ± 0,005	0,16 ± 0,006*	0,16 ± 0,006 [£]
VD/ tíbia (g/cm)	0,05 ± 0,002	0,05 ± 0,002	0,05 ± 0,002	0,05 ± 0,002
AT/ tíbia (g/cm)	0,0224 ± 0,0009	0,0234 ± 0,0008	0,0212 ± 0,0010	0,0208 ± 0,0095 [£]
Coração/ tíbia (g/cm)	0,27 ± 0,006	0,28 ± 0,006	0,23 ± 0,007*	0,23 ± 0,007 [£]

C: controle; CEx: controle exercitado; Ob: obeso; ROb: resistente à obesidade; RObEx: resistente à obesidade exercitado; VE: ventrículo esquerdo; VD: ventrículo direito; AT: átrio. Dados expressos em média ± desvio padrão. p<0,05; *(ROb vs C); #(ROb vs RObEx); &(C vs CEx); £(CEx vs RObEx). ANOVA duas vias para amostras independentes, complementada com o teste *post-hoc* de Bonferroni.

A Figura 9 apresenta os resultados da área seccional transversa (AST) de fragmento de ventrículo esquerdo dos grupos experimentais. O treinamento físico aeróbio promoveu aumento da AST do grupo controle treinado em relação ao controle sedentário (CEx vs C). No entanto, o grupo RObEx apresentou menor AST em relação ao grupo CEx. Não houve diferença significativa entre os demais grupos.



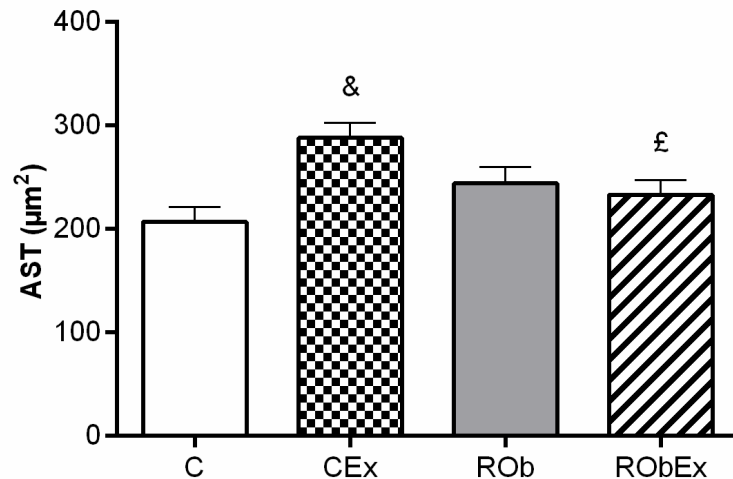


Figura 9. Área seccional transversa realizada em fragmento de ventrículo esquerdo. Grupos controle (C, n=12), controle exercitado (CEx, n=14), resistente à obesidade (ROb, n=9) e resistente à obesidade exercitado (RObEx, n=10). Dados expressos em média \pm desvio padrão. $p < 0,05$; * (ROb vs C); # (RObEx vs ROb); & (CEx vs C); £ (RObEx vs CEx). Análise de Variância ANOVA *duas vias* complementada com o teste *post-hoc* de Bonferroni.

A Figura 10 apresenta os resultados de deposição de colágeno de fragmento de ventrículo esquerdo dos grupos experimentais. O treinamento físico não promoveu alterações significativas entre os grupos. Por outro lado, a resistência à obesidade apresenta menor deposição de colágeno em relação seus respectivos controles (RObEx vs CEx; ROb vs C).

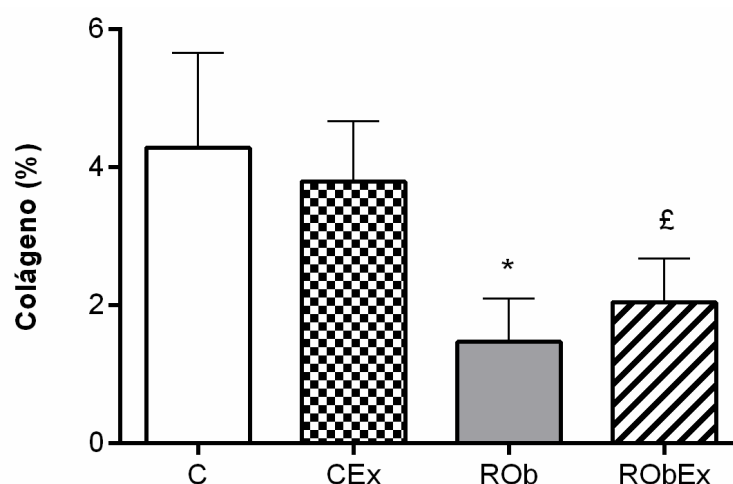


Figura 10. Deposição de colágeno em fragmento de ventrículo esquerdo. Grupos controle (C, n=12), controle exercitado (CEx, n=14), resistente à obesidade (ROb, n=9) e resistente à obesidade exercitado (RObEx, n=10). Dados expressos em média \pm desvio padrão. $p < 0,05$; * (ROb vs C); # (RObEx vs ROb); & (CEx vs C); £ (RObEx vs CEx). Análise de Variância ANOVA *duas vias* complementada com o teste *post-hoc* de Bonferroni.



A Tabela 6 mostra os valores do teor de água nos tecidos cardíaco, pulmonar e hepático. Não foi encontrada diferença significativa nas variáveis entre os grupos.

Tabela 6. Teor de água nos tecidos cardíaco, pulmonar e hepático.

Variáveis (%)	Grupos			
	C (n=12)	CEx (n=14)	ROb (n=9)	RObEx (n=10)
VE	76,3 ± 1,00	76,5 ± 0,92	76,6 ± 1,14	74,9 ± 1,09
VD	74,1 ± 2,01	73,5 ± 1,86	74,3 ± 2,32	77,5 ± 2,20
AT	78,2 ± 0,41	78,4 ± 0,38	78,2 ± 0,47	78,1 ± 0,45
Pulmão	78,3 ± 1,02	79,3 ± 0,94	79,5 ± 1,18	78,3 ± 1,12
Fígado	67,3 ± 0,51	66,8 ± 0,47	67,9 ± 0,6	66,6 ± 0,56

C: controle; CEx: controle exercitado; Ob: obeso; ROb: resistente à obesidade; RObEx: resistente à obesidade exercitado. VE: ventrículo esquerdo; VD: ventrículo direito; AT: átrio. Dados expressos em média ± desvio padrão. $p < 0,05$; ^{*}(ROb vs C); [#](ROb vs RObEx); [§](C vs CEx); [£](CEx vs RObEx). Análise de Variância ANOVA *duas vias* para amostras independentes.

Os efeitos da potenciação pós-pausa na função do músculo papilar em valores absolutos estão ilustrados na Figura 11. Os resultados dos efeitos dos tempos das manobras, 10, 30, 60 e 90 segundos, não apresentaram diferença entre os grupos para todas as variáveis (TD, +dT/dt e -dT/dt).



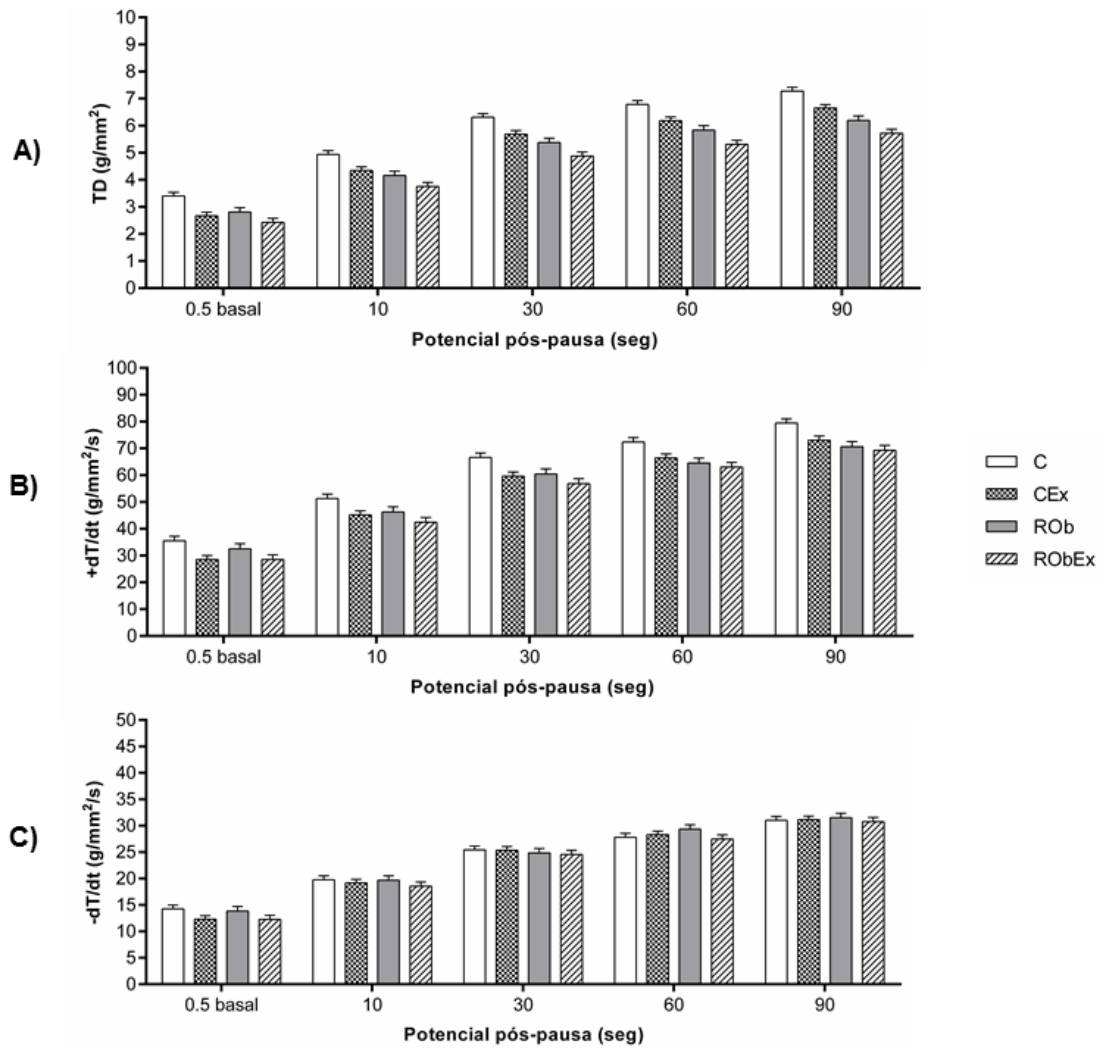


Figura 11. (A, B and C) Potencial pós-pausa do músculo papilar isolado após 20 semanas de tratamento e 12 semanas de treinamento físico. Grupos controle (C, n=12), controle exercitado (CEx, n=14), resistente à obesidade (ROb, n=9) e resistente à obesidade exercitado (RObEx, n=10). Concentração de cálcio basal: 0,5 mM; TD: tensão máxima desenvolvida; +dT/dt: velocidade máxima de variação da tensão desenvolvida; -dT/dt: velocidade máxima de variação de decréscimo da tensão desenvolvida. Dados expressos em média \pm desvio-padrão. $p < 0,05$. ANOVA duas vias para medidas repetidas, complementada com o teste *post-hoc* de Bonferroni.

Os efeitos da elevação da concentração de cálcio extracelular na função do músculo papilar em valores absolutos estão apresentados na Figura 12. Os resultados dos efeitos das concentrações de cálcio 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 e 2,5 foram semelhantes em todas as variáveis (TD, +dT/dt e -dT/dt) entre os grupos.



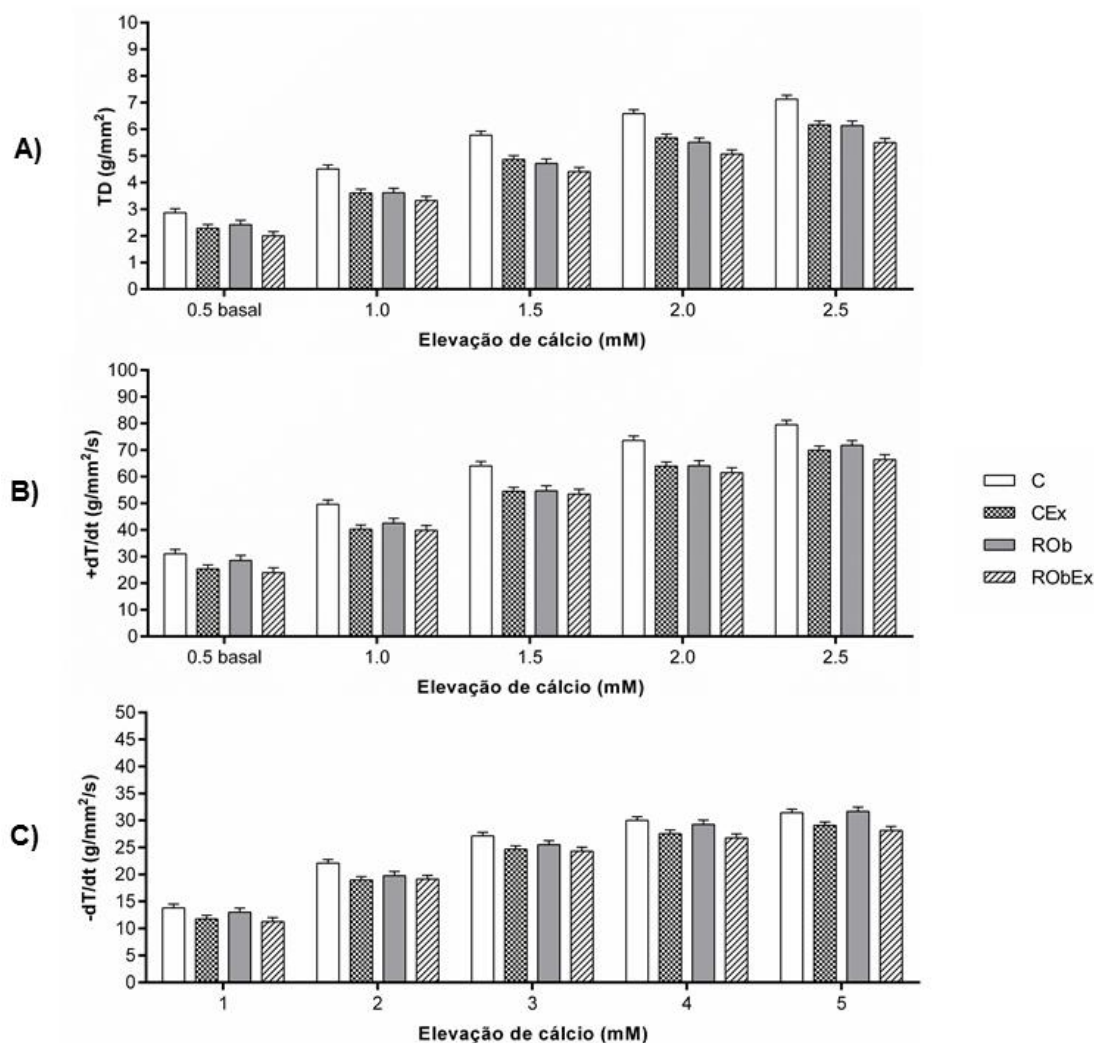


Figura 12. (A, B and C) Efeitos da elevação da concentração de cálcio extracelular de 0,5 a 2,5 mM no músculo papilar isolado após 20 semanas de tratamento e 12 semanas de treinamento físico. C (controle; 12); CEx (controle exercitado; n=14); ROb (resistente à obesidade; n=9) e RObEx (resistente à obesidade exercitado; n=10). Concentração de cálcio basal: 0,5 mM; TD: tensão máxima desenvolvida; +dT/dt: velocidade máxima de variação da tensão desenvolvida; -dT/dt: velocidade máxima de variação de decréscimo da tensão desenvolvida. Dados expressos em média \pm desvio-padrão. $p < 0,05$. ANOVA *duas vias* para medidas repetidas, complementada com o teste *post-hoc* de Bonferroni.

5 DISCUSSÃO

5.1. - Resistência à obesidade

A resistência à obesidade (ROb) é um tema em ascensão investigativa no meio científico, sobre o qual houve aumento considerável do número de publicações nos últimos anos. Porém, as primeiras pesquisas encontradas que evidenciam e caracterizam a ROb foram publicadas por volta da década de 80



e alguns dos maiores pesquisadores, a investigar o assunto, compõem a equipe liderada pelo pesquisador Dr. Barry Levin do departamento de neurologia e neurociência da New Jersey Medical School localizada em New Jersey, USA. Segundo Levin & Sullivan (1989) a resistência à obesidade está associada à interação complexa de diversos fatores metabólicos e ambientais. Dessa forma, a RO confere a capacidade de menor ganho de peso e deposição de gordura corporal mesmo ao ingerir dietas com alto teor calórico (AKIEDA-ASAI et al., 2013; JACKMAN; MACLEAN; BESSESEN, 2010), essa característica é observada tanto em humanos (CORNIER, 2009; CORNIER et al., 2013) quanto em modelos experimentais (AKIEDA-ASAI et al., 2013; JACKMAN; MACLEAN; BESSESEN, 2010; MADSEN et al., 2010). A maioria dos estudos têm utilizado modelos experimentais na tentativa de compreender quais os principais fatores comportamentais e vias metabólicas da resistência à obesidade. Nesse sentido, os roedores têm tomado lugar de destaque na escolha dos pesquisadores, o que permitiu ao longo dos anos a padronização de modelos cada vez mais específicos, como por exemplo, animais modificados geneticamente para condição de ROb (HARADA et al., 2003; RAVINET TRILLOU et al., 2004; SOLOVEVA et al., 1997). Dentre os roedores, para estudo da ROb, os ratos e camundongos são amplamente utilizados com variações que vão desde a modificação genética (HESSE et al., 2010; SIMONČIČ et al., 2011) até a identificação de fenótipos magros em cepas de animais submetidos à dieta hiperlipídica e/ou hipercalórica (FARLEY et al., 2003; SMITH et al., 2014). Importante salientar que os estudos que utilizam a identificação da ROb por submissão à dieta apresentam maior aproximação das características observadas nos seres humanos (MADSEN et al., 2010), tendo em vista que fenótipos magros são observados em alguns indivíduos e em outros não, mesmo com padrões alimentares e nível de atividade física similares (JACKMAN; MACLEAN; BESSESEN, 2010). Nesse sentido, os estudos que visam a identificação da resistência à obesidade por submissão à dieta têm utilizado, em sua maioria, ratos *Wistar* e/ou *Sprague Dawley* por essas linhagens não apresentarem intervenção genotípica. Segundo Levin (1989) aproximadamente 50% dos ratos da raça *Sprague-Dawley* apresentam ROb quando alimentados com dieta hiperlipídica. Os ratos *Wistar* parecem apresentar as mesmas características, de modo que o presente estudo



identificou 47,5% dos animais tratados com dieta hiperlipídica caracterizados como resistentes à obesidade.

Existem duas formas básicas de identificação da RO_b, pelo peso corporal e/ou percentual de gordura, as quais apresentam variações metodológicas em cada uma delas. O método frequentemente utilizado nas pesquisas é por meio do peso corporal total (JOO et al., 2011; KIM et al., 2011; LI et al., 2011; PÉREZ-ECHARRI et al., 2008), o que parece ser um bom indicativo de diferenciação. No presente estudo, a partir da 5ª semana de exposição à dieta hiperlipídica, caracterizado como *momento inicial da obesidade*, o peso corporal dos animais DH foi significativamente maior que os DP, o qual permaneceu até a 20ª semana (Figura 4). Na 20ª semana, quando aplicado o ponto PS pelo peso corporal total, os animais RO_b foram identificados em meio ao grupo DH, de modo que nesse momento foi possível não só a diferenciação, mas também, a análise da evolução do peso corporal da semana inicial até a 20ª semana de cada grupo separadamente. Os animais do grupo Ob apresentaram valores elevados de peso corporal, enquanto os ratos C e RO_b foram semelhantes. Essa característica permanece, ao longo do tempo, nos grupos C, Ob e RO_b durante as 32 semanas do protocolo experimental (Figura 5). Importante, ainda, é observar o tempo de duração dos protocolos das pesquisas sobre a RO_b, pois em sua grande maioria os trabalhos têm utilizado curtos (5-10 semanas) (AKIEDA-ASAI et al., 2013; JOO et al., 2011; LI et al., 2011) ou médios (10-15 semanas) (CARROLL; ZENEBE; STRANGE, 2006; LOUIS et al., 2012; OTUKONYONG et al., 2005) períodos de exposição à dieta. Madsen et al. (2010), ressaltam que a obesidade é uma doença crônica, que pode ter início na infância, e para melhor compreensão das características metabólicas do acúmulo de tecido adiposo torna-se necessário a utilização de longos períodos de exposição à dieta. Desta forma, é importante não apenas submeter os animais à dieta hiperlipídica para identificação da RO_b, mas também controlar o tempo de exposição à essa condição, fato este, que pode interferir nas conclusões de algumas características a respeito desse modelo.

Ainda que a caracterização da RO_b pela evolução do peso seja amplamente utilizada e tenha boa aplicação, é sabido que esse não é um indicativo fidedigno de adiposidade, pois a avaliação pelo peso não discrimina os componentes corporais tais como massa muscular, massa óssea e massa



adiposa. A pesagem não elucida a real capacidade de conversão do alimento ingerido em depósitos de gordura corporal. Para análise mais fiel da característica nutricional dos animais frente à dieta ingerida, sugere-se a utilização de métodos avaliativos capazes de diferenciar os componentes corporais (NUNES et al., 2009).

Alguns pontos específicos precisam ser observados quando se discute sobre dieta e características nutricionais, dentre eles, a quantidade de alimento ingerido, a densidade calórica da dieta e a eficiência alimentar. A inter-relação entre esses 3 componentes irá determinar a capacidade metabólica de cada animal. No presente estudo, o grupo RO_b ingeriu menor quantidade de ração em gramas em relação aos demais grupos, entretanto, os animais RO_b apresentaram maior ingestão calórica diária que o C (Tabela 1). Isso se deve a maior densidade calórica da dieta hiperlipídica em comparação à dieta padrão (Quadro 1). Ainda que tenham ingerido mais calorias que os animais do grupo C, a eficiência alimentar dos ratos RO_b é reduzida frente aos demais grupos, mesmo quando comparado aos animais que ingeriram DP. Esta característica confere a estes ratos capacidade de resistir à condição morfológica da obesidade.

A menor capacidade metabólica, que os animais RO_b possuem, de converter o alimento ingerido em ganho de peso (JACKMAN et al., 2006; LEVIN; DUNN-MEYNELL, 2006) é confirmada, no presente estudo, por menor peso corporal final. Além disso, esses animais conseguiram manter reduzidos os principais fatores relacionados ao acúmulo de tecido adiposo, como menores depósitos de gordura retroperitoneal, visceral e somatório dos depósitos de gordura, assim como o índice de adiposidade em comparação ao grupo Ob. Estudo (AKIEDA-ASAI et al., 2013), ao analisar a área seccional de adipócitos de tecido adiposo branco, observou que animais RO_b apresentam área similar aos animais do grupo controle e significativamente menor que dos animais Ob, além disso, apresentam maior expressão de carnitina palmitoil transferase e menor de ácido graxo sintase, o que reforça a ideia de que animais RO_b tem menor deposição de gordura devido a maior oxidação de lipídios e menor lipogênese. Porém, o estudo não quantificou o número de adipócitos por área, o que pode interferir na forma pela qual o metabolismo utiliza e armazena os substratos energéticos nos animais RO_b.



O tecido adiposo branco não apenas tem a função de armazenamento energético como também é um órgão endócrino secretor de diversos hormônios (PINTO, 2014) (PINTO, 2014 LER). Dentre eles, a leptina tem tomado lugar de destaque nos estudos dos últimos anos por ser o único hormônio anorexígeno produzido pelo próprio tecido adiposo e por ter estreita relação com o desenvolvimento da obesidade (GELONESE NETO; PAREJA, 2006). Quantidades elevadas de leptina circulantes são indicativos de resistência à ação desse hormônio tanto por menor sensibilidade quanto por defeito genético de seus receptores (CLÉMENT et al., 1998), o que leva à hiperfagia e consequentemente à obesidade (GELONESE NETO; PAREJA, 2006). A análise das concentrações séricas de leptina mostra que os animais do grupo RO_b apresentaram valores semelhantes aos animais do grupo controle, fato este, que pode ser associado aos baixos valores dos depósitos de gordura, o que, consequentemente, leva a produção em níveis normais desse hormônio (TULIPANO et al., 2004). Outro ponto a ser considerado é que concentrações normais de leptina indicam não haver resistência de seus receptores nem tampouco defeito genético, de forma a manter preservada a função de controle do apetite. Outro hormônio fortemente relacionado à obesidade é a insulina, o qual tem característica obesogênica (OTUKONYONG et al., 2005; WHITE et al., 2013). A concentração sérica de insulina dos animais do grupo RO_b foi semelhante à do grupo C, no entanto, quando analisado a área sob a curva obtida do teste de tolerância à glicose (GTT) observa-se maiores concentrações glicêmicas na resistência à obesidade, caracterizando intolerância à glicose. Este é um achado inusitado, pois não é comum observar essa característica nos animais RO_b em outros estudos (OTUKONYONG et al., 2005). Porém, poucos avaliaram o comportamento desse modelo exposto à dieta hiperlipídica por longo período, e essa resposta pode ser causada em virtude do tempo.

Os achados do presente estudo mostram não haver diferença significativa nos valores séricos de proteínas, triglicerídeos, glicose e colesterol total. Corroborando aos achados de outros pesquisadores (DOBRIAN et al., 2000; XIA et al., 2015), o presente estudo destaca que a dieta hiperlipídica promoveu maiores valores de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) nos grupos resistentes à obesidade, e esse pode ser um fator agressor ao sistema



cardiovascular, por desenvolvimento de comorbidades, como hipertensão arterial, diabetes mellitus tipo 2 e aterosclerose.

Os achados do presente estudo não apresentam alteração nas concentrações séricas de lactato no grupo RO_b. A literatura sugere que as concentrações de lactato podem estar relacionadas à diminuição da ingestão alimentar de animais RO_b (NAGASE; BRAY; YORK, 1996). Pesquisadores destacam que a administração periférica de piruvato e lactato estimula respostas no nervo vago e parecem exercer efeito inibidor na ingestão tanto de dieta com alto teor de gordura quanto rica em carboidratos em ratos *Osborne-Mendel*, os quais são suscetíveis à obesidade. Por outro lado, não encontraram efeito sobre o consumo de ambas dietas em ratos espontaneamente resistentes à obesidade (S5B/P) (NAGASE; BRAY; YORK, 1996).

5.1.1. - Resistência à obesidade, morfologia e função cardíaca

A literatura tem reportado fortemente a relação entre obesidade, morfologia (ABEL; LITWIN; SWEENEY, 2008; ASHRAFIAN; ATHANASIOU; LE ROUX, 2011; CUSPIDI et al., 2014; DUŠAN et al., 2015; LEOPOLDO et al., 2010; SANCHEZ; SINGH, 2014) e função cardíaca (LEOPOLDO et al., 2011; RELLING et al., 2006; REN et al., 2008; RIDER et al., 2015). A obesidade resulta em aumento do número de adipócitos, que conduz ao aumento da demanda metabólica e consequente expansão do volume circulante (ALEXANDER et al., 1962). O aumento subsequente do volume sistólico do ventrículo esquerdo (VE) induz ao aumento do débito cardíaco, que por sua vez resulta em hipertensão arterial sistêmica. Portanto, em indivíduos obesos, propõe-se que a carga de trabalho do VE é mais elevada devido ao aumento da pré-carga fazendo com que ocorra maior estresse na parede, dilatação e hipertrofia excêntrica e concêntrica, com posterior disfunção sistólica e diastólica ventricular esquerda (ASHRAFIAN; ATHANASIOU; LE ROUX, 2011).

Diferentemente ao observado nos animais que desenvolvem obesidade, o presente estudo mostra que os animais RO_b submetidos à dieta hiperlipídica (DH) insaturada apresentaram menores valores de coração total, VE e suas respectivas relações com a Tíbia. Esses achados poderiam indicar a existência de atrofia muscular (JACKMAN; KANDARIAN, 2004; OCARINO et al., 2011). No entanto, a análise da área seccional transversa de fragmentos de



VE mostra que não houve diminuição da área dos cardiomiócitos, descartando essa hipótese. Além disso, na análise de deposição de colágeno do VE foi identificada menor deposição no grupo RO_b, que pode justificar o menor peso das câmaras cardíacas (DE SOUZA et al., 2014). Não houve diferença significativa na pressão arterial sistólica na comparação entre os grupos para o fator dieta, corroborando os achados de Dobrian et. (2000) e Carroll; Zenebe; Strange (2006).

Alterações na morfologia do coração podem levar à depleção da função cardíaca (ASHRAFIAN; ATHANASIOU; LE ROUX, 2011; LEOPOLDO et al., 2010; SANCHEZ; SINGH, 2014). Poucos estudos têm avaliado e identificado as características cardíacas de ratos RO_b (CARROLL; ZENEBE; STRANGE, 2006; LOUIS et al., 2012; SÁ et al., 2015), há limitado número informações sobre a relação entre resistência à obesidade, função cardíaca e trânsito de Ca^{+2} miocárdico. Pesquisa com animais submetidos à dieta de moderado teor lipídico, por 12 semanas, não encontrou anormalidades na função cardíaca em ratos resistentes à obesidade (CARROLL; ZENEBE; STRANGE, 2006). Em contrapartida, Louis et al. (2012) mostraram que ratos RO_b submetidos à DH por 17 semanas apresentaram aumento do tempo de relaxamento isovolumétrico. Dados publicados por nosso laboratório (SÁ et al., 2015), mostraram depressão da tensão desenvolvida na potenciação pós-pausa, sem alterações na fase de relaxamento. No entanto, no presente estudo não foi possível identificar prejuízos na função cardíaca após realização de manobras inotrópicas e lusitrópicas, em preparações de músculo papilar isolado, de ratos resistentes à obesidade após 32 semanas de exposição à DH.

Uma possível justificativa para os efeitos deletérios relatados por Louis et al. (2012) e Sá et al. (2015) e a cardioproteção dos animais RO_b observada no presente estudo, parece estar relacionada ao tempo de exposição à dieta. Os dois estudos anteriores realizaram as análises com períodos de duração similares, ou seja, entre 17 e 20 semanas de exposição à DH, diferentemente das análises dos resultados após 32 semanas de exposição, aqui demonstrados. Lima-Leopoldo et al. (2014), evidenciam que ratos obesos por exposição à DH por 15 semanas, apresentaram, inicialmente, redução da expressão gênica das principais proteínas do trânsito de cálcio (SERCA2a, RyR, PLB, canal de Ca^{+2} , CSQ e NCX). No entanto, após 30



semanas, os níveis de RNAm aumentaram na possível tentativa de reestabelecer a função cardíaca. Quando essas análises foram realizadas após 45 semanas a transcrição de RNAm retornou a taxas reduzidas e/ou normais. Os autores sugerem que houve remodelamento dos processos cardíacos após longos períodos de exposição à obesidade devido à sobrecarga de gordura imposta ao coração, de modo que, após 15 semanas, tal sobrecarga representa uma agressão ao coração (obesidade), o qual se remodela como forma de adaptação para normalizar as alterações cardíacas moleculares e celulares próximo a semana 30 (LIMA-LEOPOLDO et al., 2014). Porém, após 45 semanas, há redução da expressão de RNAm das proteínas do trânsito de cálcio miocárdico, indicando que longos períodos de exposição à DH acarretam prejuízos cardíacos (LIMA-LEOPOLDO et al., 2014).

Neste sentido, sugere-se que a falta de prejuízos cardíacos observados no presente estudo deve-se a três fatores centrais; primeiro ao tempo intermediário de exposição à dieta, como relatado por Lima-Leopoldo et al. (2014); segundo pela falta de acúmulo excessivo de tecido adiposo nos animais ROb, fator este, que por si só causa prejuízos cardíacos (HASLAM; JAMES, 2005; RIDER et al., 2015) e terceiro pela composição da DH, a qual é composta predominantemente por ácidos graxos insaturados.

Cardiomiopatia lipotóxica é uma evidência experimental que pode ser acarretada pelo aumento da disponibilidade de ácido graxo, em virtude de uma dieta rica em gordura. No entanto, parece que as dietas hiperlipídicas parecem ser neutras e/ou cardioprotetoras, especialmente quando compostas por elevado teor de ácidos graxos poli-insaturados (CHESS; STANLEY, 2008). O consumo de dieta rica em gordura vegetal, especificamente de ácidos graxos poli-insaturados, diminui o risco de doenças coronarianas (CHESS; STANLEY, 2008). No entanto, parece não haver consenso na literatura sobre o papel da ingestão de gordura no desenvolvimento da disfunção cardíaca. Contrapondo estudos que observaram prejuízos cardíacos com a utilização de DH insaturada (FERRON et al., 2015; LEOPOLDO et al., 2010, 2011; LIMA-LEOPOLDO et al., 2014; SÁ et al., 2015), trabalhos evidenciam que a alta ingestão de ácidos graxos poli-insaturados de peixe (ômega-3) está associada com menor incidência de disfunção cardíaca (BELIN et al., 2011). Resultado semelhante foi observado em ratos com hipertrofia ventricular esquerda e



disfunção cardíaca, induzidas por estenose aórtica, sugerindo que a ingestão de ácidos graxos poli-insaturados atenua o desenvolvimento de hipertrofia do VE, remodelamento cardíaco e disfunção contrátil (DUDA et al., 2009). Den Ruijter et al. (2012) relatam que dietas ricas em Omega-3 parecem ser superiores na redução dos triglicérides plasmáticos. Em adição, os autores mostram que ácidos graxos monoinsaturados não apenas têm efeitos anti-hipertroáficos cardíacos como, também, possuem características metabólicas favoráveis (DEN RUIJTER et al., 2012). Importante ressaltar, que pesquisas que têm como foco o estudo dos mecanismos envolvidos na disfunção cardíaca, por meio de DH, devem controlar as fontes lipídicas que compõem essa dieta.

A literatura (CARROLL; ZENEBE; STRANGE, 2006; JACKMAN; MACLEAN; BESSESEN, 2010; LOUIS et al., 2012) que estuda a ROb por meio de DH, em sua maioria, não apontam os componentes e as características dos ácidos graxos presentes na dieta. Deste modo, em virtude do número reduzido de estudos e a divergência dos resultados sobre a relação entre ROb e função cardíaca, os mecanismos envolvidos na disfunção cardíaca são desconhecidos neste modelo animal, tornando os achados inconclusivos.

5.2. - Protocolo de treinamento físico

A resistência à obesidade (ROb) apresenta capacidade metabólica favorável à utilização das reservas energéticas corporais, mesmo em condição sedentária (MACLEAN et al., 2004). Porém, pouco se sabe sobre os efeitos do treinamento físico (TF) e sobre sua comparação frente ao sedentarismo no modelo de ROb. Para análise da influência do TF foi aplicado um protocolo de treinamento aeróbio de intensidade moderada (70% do TVM) em esteira rolante durante 12 semanas.

Estudos têm utilizado em larga escala a análise do nível de atividade física (NOVAK C, KOTZ C, 2006; PATTERSON; DUNN-MEYNELL; LEVIN, 2008; TESKE; BILLINGTON; KOTZ, 2014), do exercício físico (EF) (NATALI, 2004; FARID et al., 2005; LEVIN; DUNN-MEYNELL, 2006; LOCATELLI et al., 2009; PINHEIRO et al., 2007) e do treinamento físico (TF) (CARNEIRO-JÚNIOR et al., 2013; DIFEE; NAGLE, 2003; PACAGNELLI et al., 2014; PAULINO et al., 2010) nos últimos anos. No entanto, é de extrema importância



compreender as particularidades de cada uma dessas variações do movimento corporal para que alguns erros metodológicos sejam sanados. A análise do fator atividade física é a mensuração ou mapeamento do movimentar-se cotidiano, ou seja, não há a sistematização. Segundo Caspersen; Powell e Christenson (1985), a atividade física é definida como qualquer movimento corporal, produzido pelos músculos esqueléticos, que resulta em aumento do gasto energético acima dos níveis de repouso. O exercício físico, no entanto, não é sinônimo de atividade física, é uma subcategoria. O EF é uma atividade física planejada, estruturada, repetida e proposital no sentido de que o objetivo é a melhora ou manutenção das valências físicas (CASPERSEN; POWELL; CHRISTENSON, 1985). Tanto a atividade física quanto o EF são medidos pela utilização diária de quilocalorias e são positivamente correlacionados com a intensidade, duração e frequência de movimentos (CASPERSEN; POWELL; CHRISTENSON, 1985).

Deste modo, o TF é um programa de exercícios físicos planejados e sistematizados a priori, com a finalidade de garantir maior eficiência, segurança e evitar efeitos adversos, de modo que possui características específicas que precisam ser seguidas para garantir os resultados almejados. Em alguns casos, é possível observar equívocos em alguns estudos que, por exemplo, utilizam o termo EF quando na verdade estão aplicando protocolos de TF, ou até mesmo, realizando análises do nível de atividade física (LEVIN; DUNN-MEYNELL, 2006; PATTERSON; DUNN-MEYNELL; LEVIN, 2008).

Dentre alguns dos mais importantes princípios do treinamento físico sugeridos por Kenney; Wilmore & Costil (2013), a sobrecarga, a adaptação e a individualidade biológica necessitam de atenção especial no planejamento e desenvolvimento metodológico de um programa de treinamento. Nesse sentido, o presente estudo aplicou testes de carga em cada animal respeitando a individualidade biológica, a qual representa um papel importante na determinação da resposta do organismo a uma única sessão de exercício, bem como alterações crônicas ao programa de treinamento. Diferenças nas taxas de crescimento celular, metabolismo, regulação cardiovascular, respiratória, neural e regulação endócrina levam a uma enorme variação individual. De acordo com o princípio da sobrecarga, as cargas de treino foram ajustadas gradativamente para que fosse possível ocorrer adaptação antes da submissão



a uma nova carga. Ainda respeitando o princípio da adaptação e da sobrecarga, foram realizados retestes a cada duas semanas para garantir que cada animal estivesse realmente treinando na zona de intensidade proposta nesse estudo (KENNEY; WILMORE; COSTIL, 2013).

Importante salientar que o controle das variáveis básicas, acima discutidas, é de fundamental importância para o trabalho utilizando o treinamento físico.

5.2.1. - Resistência à obesidade e treinamento físico

Na análise isolada da influência do treinamento físico (TF), as comparações foram realizadas entre os grupos treinados *versus* sedentários (CEx vs C; ROEx vs RO).

Diversos estudos evidenciam a eficácia do treinamento físico aeróbio na redução do percentual de gordura e consequentemente dos depósitos de gordura corporal (BURNEIKO et al., 2006; DANTAS et al., 2010; ROLLS; ROWE, 1979; SCHMIDT et al., 2012). Corroborando essa afirmação, o presente estudo mostra que o TF foi eficiente na diminuição do ganho de peso e do peso corporal final. Em adição, todas as variáveis relacionadas à deposição de gordura corporal como a eficiência alimentar, o índice de adiposidade, os depósitos de gordura retroperitoneal, visceral, epididimal e gordura total, foram diminuídas nos grupos treinados em relação aos sedentários (CEx < C e ROEx < RO). Importante ressaltar que a resistência à obesidade, por si só, apresenta a capacidade de manter a adiposidade similar aos animais controles.

Não foi verificado disparidade na ingestão alimentar e calórica entre os grupos treinados e os sedentários. Levin e Dunn-Meynell, (2004) relatam que o fator treinamento físico parece exercer controle do apetite e consequentemente regula a ingestão calórica; resultado não observado no presente estudo. Deste modo, os benefícios observados na melhora da composição corporal, evidenciados nesse estudo, estão relacionados diretamente ao efeito do TF.

No presente estudo, o TF não promoveu alterações nos níveis de glicose, colesterol total, triglicerídeos, proteína, HDL e lactato entre os grupos. Os animais do grupo RO, isoladamente, apresentam níveis séricos elevados



de LDL (ROb > C), contudo, o TF foi capaz de atenuar esse parâmetro nos grupos exercitados quando comparados aos sedentários (CEx < C e RObEx < ROb). Deste modo, o TF parece ser um fator protetor contra a doença coronariana nos animais ROb, principalmente por diminuir o risco de formação de placa de ateroma em decorrência da diminuição do LDL circulante, mesmo sem alterações nas concentrações séricas de HDL (BURNEIKO et al., 2006).

Dobrian et al. (2000), utilizando protocolo de submissão à dieta hiperlipídica por 10 semanas, relataram que ratos obesos desenvolvem hipertensão arterial enquanto os resistentes à obesidade não, sugerindo que a dieta não é o principal fator a elevar a pressão arterial (PA) neste modelo. A hipertensão também é correlacionada com a atividade da renina plasmática, indicando que a ativação do sistema renina-angiotensina pode ser uma das principais causas do aumento da PA em ratos Ob (DOBRIAN et al., 2000). No presente estudo, a pressão arterial sistólica do grupo ROb treinado foi significativamente maior que do ROb sedentário, bem como do CEx. Esses achados contradizem o que a literatura tem afirmado sobre os efeitos do TF no controle da pressão arterial (BRUM; NEGRÃO, 2004). No entanto, o resultado evidenciado no presente estudo aponta para um efeito da interação entre DH e TF, uma vez que esse comportamento não foi visualizado no grupo treinado submetido à DP. Vale ressaltar, que os poucos trabalhos encontrados que avaliam a relação entre atividade física e resistência à obesidade não avaliaram a pressão arterial (COUTURIER et al., 2004; LEVIN; DUNN-MEYNELL, 2006; NOVAK C, KOTZ C, 2006; PATTERSON; DUNN-MEYNELL; LEVIN, 2008; TESKE; BILLINGTON; KOTZ, 2014). Deste modo, o presente estudo parece ser o primeiro a relatar a influência de um programa de treinamento físico aeróbio na pressão arterial em ratos resistentes à obesidade. Os resultados mostram que os animais ROb quando submetidos à DH por prolongados períodos e ao treinamento físico, apresentam elevados valores pressóricos quando comparados aos ROb sedentários.

Na análise do perfil da área sob a curva (ASC), a dieta hiperlipídica insaturada promoveu maiores valores nos grupos ROb indicando intolerância à glicose, porém o treinamento físico aeróbio não foi capaz de reverter esse quadro. A falta de resposta positiva do efeito do TF sobre a intolerância à glicose contradiz os resultados reportados na literatura, de modo que, estudos



têm demonstrado que o treinamento físico aeróbio atenua a intolerância à glicose (BOULÉ et al., 2005; SMUTOK et al., 1994).

5.2.1.1. - Influência do treinamento físico na morfologia e função cardíaca na resistência à obesidade

No presente estudo, os ratos resistentes à obesidade apresentaram menores valores de peso das câmaras cardíacas, bem como do coração total, quando comparados aos ratos controles. Esses valores foram constatados por menor deposição de colágeno no coração. O modelo de resistência à obesidade tratado com dieta hiperlipídica insaturada por 32 semanas, difere da obesidade, a qual que pode induzir aumento na matriz extracelular, principalmente na fração do colágeno (DA SILVA et al., 2014).

No presente estudo o TF não modificou valores de colágeno observados nas câmaras cardíacas dos animais resistentes à obesidade. Esses resultados corroboram estudos que mostraram que o conteúdo total de colágeno no coração não é alterado em ratos submetidos ao exercício físico aeróbio em comparação com ratos não treinados (JIN et al., 2000; BURGESS et al., 1996).

Contudo, os valores diminuídos do peso das câmaras cardíacas e a menor deposição de colágeno não parecem interferir na fisiologia do coração na resistência à obesidade, uma vez que a área seccional transversa dos cardiomiócitos, o acúmulo de água nos tecidos e a função cardíaca, avaliada por preparações de músculo papilar isolado, permaneceram inalteradas nesta condição.

Não foram identificados na literatura estudos que avaliaram a influência do treinamento físico sobre os parâmetros cardíacos na condição de resistência à obesidade.

6 CONCLUSÃO

Em conclusão, os animais resistentes à obesidade (ROb), mesmo quando submetidos à prolongado período de dieta hiperlipídica insaturada, são capazes de manter a maioria das características de composição corporal



similares ao grupo controle. A condição de resistência à obesidade não acarretou prejuízos funcionais cardíacos. No entanto, o modelo de ROb apresenta menor deposição de colágeno intersticial, com preservada área seccional transversa dos cardiomiócitos.

O treinamento físico (TF) aeróbio de moderada intensidade não promove alterações tanto na morfologia quanto na função cardíaca em animais resistentes à obesidade.



7 REFERÊNCIAS

ABEL, E. D.; LITWIN, S. E.; SWEENEY, G. Cardiac Remodeling in Obesity. **Physiol Rev**, v. 88, n. 2, p. 389–419, apr. 2008.

AKIEDA-ASAI, S. et al. Metabolic features of rats resistant to a high-fat diet. **Obesity Research and Clinical Practice**, v. 7, n. 4, p. e243–e250, jan. 2013.

AKIYAMA, T. et al. High-fat hypercaloric diet induces obesity, glucose intolerance and hyperlipidemia in normal adult male Wistar rat. **Diabetes Res Pract**, v. 31, n 1-3, p. 27-35, 1996.

ALEXANDER, J. K. et al. Blood volume, cardiac output, and distribution of systemic blood flow in extreme obesity. **Cardiovascular Research Center Bulletin**, v. 1, p. 39-44, 1962.

ALONSO, M. et al. Anti-obesity efficacy of LH-21, a cannabinoid CB 1 receptor antagonist with poor brain penetration, in diet-induced obese rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 165, n. 7, p. 2274–2291, sep. 2011.

ASHRAFIAN, H.; ATHANASIOU, T.; LE ROUX, C. W. Heart remodelling and obesity: the complexities and variation of cardiac geometry. **Heart (British Cardiac Society)**, v. 97, n. 3, p. 171–2, feb. 2011.

BELIN, R. J. et al. Fish intake and the risk of incident heart failure the women's health initiative. **Circulation: Heart Failure**, v. 4, n. 4, p. 404–413, apr. 2011.

BERS, D. M. Cardiac excitation-contraction coupling. **Nature**, v. 415, n. January, p. 198–205, jan. 2002.

BÖGEHOLZ, N.; MUSZYNSKI, A.; POTT, C. The physiology of cardiac calcium handling. **Wiener Medizinische Wochenschrift**, v. 162, n. 13-14, p. 278–282, jun. 2012.

BORST, S. E.; CONOVER, C. F. High-fat diet induces increased tissue expression of TNF- α . **Life Sciences**, v. 77, n. 17, p. 2156–2165, mar. 2005.

BOULÉ, N. G. et al. Effects of Exercise Training on Glucose Homeostasis. **Diabetes Care**, v. 28, n. 1, jan. 2005.



BROWN, M. et al. Sibutramine reduces feeding, body fat and improves insulin resistance in dietary-obese male Wistar rats independently of hypothalamic neuropeptide Y. **British Journal of Pharmacology**, v. 132, n. 8, p. 1898–1904, feb. 2001.

BRUM, P. C.; NEGRÃO, C. E. Adaptações agudas e crônicas do exercício físico no sistema cardiovascular. **Rev Paul Educ Fís**, v. 18, n. ago, n. esp., p. 21–31, ago. 2004.

BUETTNER, R.; BUETTNER, R. High-fat Diets: Modeling the Metabolic Disorders of Human Obesity in Rodents * High-fat Diets: Modeling the Metabolic Disorders of Human Obesity in Rodents. **Obesity (Silver Spring)**, v. 15, n. apr. 2007.

BURGESS, M. L.; BUGGY, J.; PRICE, R. L. Exercise- and hypertension-induced collagen changes and related to left ventricular function in rat hearts. **American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology**, v. 270, p. 151-159, jan. 1996.

BURNEIKO, R. C. M. et al. Interaction of hypercaloric diet and physical exercise on lipid profile, oxidative stress and antioxidant defenses. **Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 44, n. 7, p. 1167–72, jan. 2006.

CAO, Z. H. et al. Effect of pu-erh tea on body fat and lipid profiles in rats with diet-induced obesity. **Phytotherapy Research**, v. 25, n. 2, p. 234–238, jul. 2011.

CALVI, E. N. et al. An experimental model for the study of collagen fibers in skeletal muscle. **Acta Cir Bras**, v. 27, n. 10, p. 681-686, Oct. 2012.

CARNEIRO-JÚNIOR, M. A. et al. Regional effects of low-intensity endurance training on structural and mechanical properties of rat ventricular myocytes. **Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 115, n. 1, p. 107–115, jul. 2013.

CARROLL, J. F.; ZENEBE, W. J.; STRANGE, T. B. Cardiovascular function in a rat model of diet-induced obesity. **Hypertension**, v. 48, n. 1, p. 65–72, apr. 2006.



CASPERSEN, C. J.; POWELL, K. E.; CHRISTENSON, G. M. Physical activity, exercise, and physical fitness: definitions and distinctions for health-related research. **Public Health Reports**, v. 100, n. 2, p. 126–131, mar./apr. 1985.

CICOGNA, A. C. et al. Myocardial function during chronic food restriction in isolated hypertrophied cardiac muscle. **Am J Med Sci**, v. 320, n. 4, p. 244–248, oct. 2000.

CHESS, D. J.; STANLEY, W. C. Role of diet and fuel overabundance in the development and progression of heart failure. **Cardiovascular Research**, v. 79, n. 2, p. 269–278, mar. 2008.

CLÉMENT, K. et al. A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. **Nature**, v. 392, n. 6674, p. 398–401, mar. 1998.

CORNIER, M. A. The effects of overfeeding and propensity to weight gain on the neuronal responses to visual food cues. **Physiology and Behavior**, v. 97, n. 5, p. 525–530, mar. 2009.

CORNIER, M. A. et al. Differences in the neuronal response to food in obesity-resistant as compared to obesity-prone individuals. **Physiology and Behavior**, v. 110–111, p. 122–128, jan. 2013.

COUTURIER, K. et al. Metabolic and hormonal responses to exercise in the anti-obese Lou/C rats. **International journal of obesity and related metabolic disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity**, v. 28, n. 8, p. 972–8, jun. 2004.

CUSPIDI, C. et al. Left-ventricular hypertrophy and obesity: a systematic review and meta-analysis of echocardiographic studies. **Journal of Hypertension**, v. 32, n. 1, p. 16–25, jan. 2014.

DA SILVA, D. C. T. et al. Influence of Term of Exposure to High-Fat Diet-Induced Obesity on Myocardial Collagen Type I and III. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 102, n. 2, p. 157–164, ago. 2014.

DANTAS, E. M. et al. Effects of chronic treadmill training on body mass gain and visceral fat accumulation in overfed rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 43, n. 5, p. 515–521, may 2010.



DAVID, J. S. et al. Interaction of Protamine with α - and β -Adrenoceptor Stimulations in Rat. **Myocardium Anesthesiology**, v. 95, p. 1226–1233, nov. 2001.

DE SIMONE, G. Morbid obesity and left ventricular geometry. **Hypertension**, v. 49, n. 1, p. 7–9, jan. 2007.

DE SOUZA, F. R. et al. Resposta Hipertrófica da Associação de Hormônio Tireoidiano e de Exercício Físico no Coração de Ratos. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 102, n. 2, p. 187–190, set. 2014.

DEN RUIJTER, H. M. et al. A diet rich in unsaturated fatty acids prevents progression toward heart failure in a rabbit model of pressure and volume overload. **Circulation: Heart Failure**, v. 5, n. 3, p. 376–384, mar. 2012.

DIFEE, G. M.; NAGLE, D. F. Exercise training alters length dependence of contractile properties in rat myocardium. **Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 94, n. 3, p. 1137–44, oct. 2003.

DINIZ, Y. S. et al. Toxicity of hypercaloric diet and monosodium glutamate: Oxidative stress and metabolic shifting in hepatic tissue. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, n. 2, p. 319–325, sep. 2004.

DOBRIAN, A. D. et al. Development of Hypertension in a Rat Model of Diet-Induced Obesity. **Hypertension**, v. 35, n. 4, p. 1009–1015, apr. 2000.

DU TOIT, E. F.; NABBEN, M.; LOCHNER, A. A potential role for angiotensin II in obesity induced cardiac hypertrophy and ischaemic/reperfusion injury. **Basic Research in Cardiology**, v. 100, n. 4, p. 346–354, apr. 2005.

DUDA, M. K. et al. NIH Public Access. **Cardiovascular Research**, v. 76, n. 2, p. 303–310, sep. 2009.

DUŠAN, P. et al. Left ventricular mass and diastolic function in obese children and adolescents. **Pediatric Nephrology (Berlin, Germany)**, v. 30, n. 4, p. 645–52, oct. 2015.

FARID, R. et al. Effect of Aerobic Exercise Training on Pulmonary Function and Tolerance of Activity in Asthmatic Patients. v. 4, n. 3, p. 133–138, sep. 2005.



FARLEY, C. et al. Meal pattern analysis of diet-induced obesity in susceptible and resistant rats. **Obesity research**, v. 11, n. 7, p. 845–851, jul. 2003.

FERRON, A. J. T. et al. Cardiac dysfunction induced by obesity is not related to β -adrenergic system impairment at the receptor-signalling pathway. **PLoS ONE**, v. 10, n. 9, p. 1–18, sep. 2015.

GELONESE NETO, B.; PAREJA, J. C. Mecanismos hormonais do controle de peso corporal e suas possíveis implicações para o tratamento da obesidade. **Einstein**, v. Supl 1, n., p. S18–S22, abr. 2006.

HAMED, N. S.; ABD-ELLATIF, N. A. Effect of high intensity interval training on diabetic obese women with polyneuropathy: a randomized controlled clinical trial. **Physical Therapy and Rehabilitation**, v. 1, n. 1, p. 4, jun. 2014.

HANEVOLD, C. et al. The effects of obesity, gender, and ethnic group on left ventricular hypertrophy and geometry in hypertensive children: a collaborative study of the International Pediatric Hypertension Association. **Pediatrics**, v. 113, n. 2, p. 328–333, feb. 2004.

HARADA, K. et al. Resistance to high-fat diet-induced obesity and altered expression of adipose-specific genes in HSL-deficient mice. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 285, n. 6, p. E1182–95, aug. 2003.

HASLAM, D. W.; JAMES, W. P. T. Obesity. **Lancet**, v. 366, n. 9492, p. 1197–1209, oct. 2005.

HESSE, D. et al. Behavioural mechanisms affecting energy regulation in mice prone or resistant to diet- induced obesity. **Physiology and Behavior**, v. 99, n. 3, p. 370–380, dec. 2010.

HU, F. B. Diet and Cardiovascular Disease Prevention. **Journal of American College of Cardiology**, v. 50, n. 1, p. 22–24, jul. 2007.

JACKMAN, M. R. et al. Trafficking of dietary fat in obesity-prone and obesity-resistant rats. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 291, n. 5, p. E1083–91, jun. 2006.



JACKMAN, M. R.; MACLEAN, P. S.; BESSESEN, D. H. Energy expenditure in obesity-prone and obesity-resistant rats before and after the introduction of a high-fat diet. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 299, n. 4, p. R1097–105, aug. 2010.

JACKMAN, R. W.; KANDARIAN, S. C. The molecular basis of skeletal muscle atrophy. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 287, n. 4, p. C834–43, oct. 2004.

JIN, H. et al. Effects of exercise training on cardiac function, gene expression, and apoptosis in rats. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 279, n. 6, p. H2994–3002, jun. 2000.

JONSHON, R. A.; WICHERN, D. W. **Applied multivariate statistical analysis**. 6 ed. New Jersey: Prentice-Hall, 2008. 800 p.

JOO, J. I. et al. Differential expression of adipose tissue proteins between obesity-susceptible and -resistant rats fed a high-fat diet. **Proteomics**, v. 11, n. 8, p. 1429–1448, jan. 2011.

KEMI, O. J. et al. Aerobic interval training enhances cardiomyocyte contractility and Ca²⁺ cycling by phosphorylation of CaMKII and Thr-17 of phospholamban. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 43, n. 3, p. 354–361, jul. 2007.

KENNEY, W. L.; WILMORE, J. H.; COSTILL, D. L. **Fisiologia do esporte e do exercício**. 5. ed. São Paulo: Manole, 2013. 644 p.

KIM, D. H. et al. Obesity-Prone and Obesity-Resistant Rats Induced by a High-Fat Diet. p. 1281–1292, dec. 2011.

KOPELMAN, P. G. Obesity as a medical problem. **Nature**, v. 404, n. 6778, p. 635–643, apr. 2000.

KREBS, H. A.; HENSELEIT, K. Studies on urea formation in the animal organism. Hoppe-Seylers Z. **Physiol. Chem**, v. 210, p. 33-66, 1932.

LEOPOLDO, A. S. et al. Cardiac remodeling in a rat model of diet-induced obesity. **The Canadian journal of cardiology**, v. 26, n. 8, p. 423–429, oct. 2010.



LEOPOLDO, A. S. et al. Involvement of L-type calcium channel and serca2a in myocardial dysfunction induced by obesity. **Journal of Cellular Physiology**, v. 226, n. 11, p. 2934–2942, feb. 2011.

LEVIN, B. E. et al. Differential stress responsivity in diet-induced obese and resistant rats. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 279, p. R1357–R1364, jun. 2000.

LEVIN, B. E.; DUNN-MEYNELL, A. A. Differential effects of exercise on body weight gain and adiposity in obesity-prone and -resistant rats. **International journal of obesity (2005)**, v. 30, n. 4, p. 722–7, jan. 2006.

LEVIN, B. E.; DUNN-MEYNELL, A. A. Chronic exercise lowers the defended body weight gain and adiposity in diet-induced obese rats. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 286, n. 4, p. R771–R778, dec. 2003.

LEVIN, B. E.; SULLIVAN, A. C. Differences in saccharin-induced cerebral glucose utilization between obesity-prone and -resistant rats. **Brain Research**, v. 488, n. 1-2, p. 221–232, nov. 1989.

LI, J. et al. Effects of changing dietary fat content on plasma gut hormone concentrations in diet-induced obese and diet-resistant rats. **The British journal of nutrition**, v. 105, n. 6, p. 879–86, nov. 2011.

LIMA-LEOPOLDO, A. P. et al. Long-term obesity promotes alterations in diastolic function induced by reduction of phospholamban phosphorylation at serine-16 without affecting calcium handling. **J Appl Physiol (1985)**, v. 117, n. 6, p. 669–678, oct. 2014.

LOCATELLI, E. C. et al. Exercícios físicos na doença arterial obstrutiva periférica Physical exercise in peripheral occlusive arterial disease. **J. vasc. bras**, v. 8, n. 3, p. 247–254, jul. 2009.

LOCATELLI, J.; DE ASSIS, L. V. M.; ISOLDI, M. C. Calcium handling proteins: Structure, function, and modulation by exercise. **Heart Failure Reviews**, v. 19, n. 2, p. 207–225, feb. 2014.

LOUIS, X. L. et al. Treatment with low-dose resveratrol reverses cardiac



impairment in obese prone but not in obese resistant rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 23, n. 9, p. 1163–1169, jun. 2012.

MACLEAN, P. S. et al. Enhanced metabolic efficiency contributes to weight regain after weight loss in obesity-prone rats. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 287, n. 6, p. R1306–15, aug. 2004.

MADSEN, A. N. et al. Long-term characterization of the diet-induced obese and diet-resistant rat model: A polygenetic rat model mimicking the human obesity syndrome. **Journal of Endocrinology**, v. 206, n. 3, p. 287–296, may 2010.

MATSUBARA, L. S. et al. Alterations in myocardial collagen content affect rat papillary muscle function. **American Journal of Physiology**, v. 279, p. H1534–H1539, apr. 2000.

MATTHEWS, D. R. et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. **Diabetologia**, v. 28, n. 7, p. 412–419, may 1985.

MOINUDDIN, I.; LEEHEY, D. J. A Comparison of Aerobic Exercise and Resistance Training in Patients With and Without Chronic Kidney Disease. **Advances in Chronic Kidney Disease**, v. 15, n. 1, p. 83–96, jan. 2008.

MORAES-SILVA, I. et al. Baroreflex deficit blunts exercise training-induced cardiovascular and autonomic adaptations in hypertensive rats. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 37, n. 3, p. 114–120, nov. 2010.

NAGASE, H.; BRAY, G. A.; YORK, D. A. Pyruvate and hepatic pyruvate dehydrogenase levels in rat strains sensitive and resistant to dietary obesity. **Am J Physiol**, v. 270, n. 3 Pt 2, p. R489–95, feb. 1996.

MOSTARDA, C. et al. Exercise training prevents diastolic dysfunction induced by metabolic syndrome in rats. **Clinics (São Paulo, Brazil)**, v. 67, n. 7, p. 815–20, mar. 2012.

NATALI, A. J. Efeitos do exercício crônico sobre os miócitos cardíacos : uma revisão das adaptações mecânicas. **Revista brasileira de Ciência e Movimento**, p. 91–96, jan./mar. 2004.



NOVAK, C. M.; KOTZ, C. M.; LEVINE, J. A. Central orexin sensitivity , physical activity , and obesity in diet - induced obese and diet - resistant rats . PubMed Commons. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 290, n. 2, p. 396–398, sep. 2006.

NUNES, R. R. et al. Reliability of the classification of nutritional status obtained through the BMI and three different methods of body fat percentage in patients with type 1 diabetes mellitus. **Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia**, v. 53, n. 3, p. 360–367, may 2009.

OCARINO, N. M. et al. Bilateral ventricular myocardial dysplasia in a Shar-Pei dog. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 3, p. 765–767, abr. 2011.

OTUKONYONG, E. E. et al. High-fat Diet-induced Ultradian Leptin and Insulin Hypersecretion are Absent in Obesity-resistant Rats. **Obes.Res.**, v. 13, n. 6, p. 991–999, jun. 2005.

PACAGNELLI, F. L. et al. Physical training attenuates cardiac remodeling in rats with supra-aortic stenosis. **Experimental and Clinical Cardiology**, v. 20, n. 8, p. 3889–3905, 2014.

PAGLIASSOTTI, M. J. et al. Tissue oxidative capacity, fuel stores and skeletal muscle fatty acid composition in obesity-prone and obesity-resistant rats. **Obesity research**, v. 3, n. 5, p. 459–64, sep. 1995.

PATTERSON, C. M.; DUNN-MEYNELL, A. A.; LEVIN, B. E. Three weeks of early-onset exercise prolongs obesity resistance in DIO rats after exercise cessation. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 294, n. 2, p. R290–301, nov. 2007.

PAULINO, E. C. et al. Exercise training and caloric restriction prevent reduction in cardiac Ca^{2+} -handling protein profile in obese rats. **Hypertension**, v. 56, n. 4, p. 629–635, jun. 2010.

PÉREZ-ECHARRI, N. et al. Differential inflammatory status in rats susceptible or resistant to diet-induced obesity: Effects of EPA ethyl ester treatment. **European Journal of Nutrition**, v. 47, n. 7, p. 380–386, sep. 2008.

PINHEIRO, A. R. et al. Beneficial effects of physical exercise on hypertension



and cardiovascular adverse remodeling of diet-induced obese rats. **Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases: NMCD**, v. 17, n. 5, p. 365–75, jan. 2007.

PINTO, W. D. J. A Função Endócrina do Tecido Adiposo. **Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba**, v. 16, n. 3, p. 111-120, out. 2014.

RAVINET TRILLOU, C. et al. CB1 cannabinoid receptor knockout in mice leads to leanness, resistance to diet-induced obesity and enhanced leptin sensitivity. **International Journal of Obesity**, v. 28, n. 4, p. 640–648, feb. 2004.

RELLING, D. P. et al. High-fat diet-induced juvenile obesity leads to cardiomyocyte dysfunction and upregulation of Foxo3a transcription factor independent of lipotoxicity and apoptosis. **Journal of Hypertension**, v. 24, n. 3, p. 549–561, nov. 2006.

REN, J. et al. High-fat diet-induced obesity leads to resistance to leptin-induced cardiomyocyte contractile response. **Obesity (Silver Spring, Md.)**, v. 16, n. 11, p. 2417–2423, nov. 2008.

RIDER, O. J. et al. Myocardial tissue phase mapping reveals impaired myocardial tissue velocities in obesity. **International Journal of Cardiovascular Imaging**, v. 31, n. 2, p. 339–347, oct. 2015.

RODRIGUES, B. et al. Maximal exercise test is a useful method for physical capacity and oxygen consumption determination in streptozotocin-diabetic rats. **Cardiovasc Diabetol**, v. 6, p. 38, dec. 2007.

ROLLS, B. J.; ROWE, E. A. Exercise and the development and persistence of dietary obesity in male and female rats. **Physiology and Behavior**, v. 23, n. 2, p. 241–247, nov. 1979.

SÁ, F. G. DOS S. DE et al. Obesity Resistance Promotes Mild Contractile Dysfunction Associated with Intracellular Ca²⁺ Handling. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, jul. 2015.

SANCHEZ, A. A.; SINGH, G. K. Early Ventricular Remodeling and Dysfunction in Obese Children and Adolescents. **Current Treatment Options in Cardiovascular Medicine**, v. 16, n. 10, aug. 2014.



SCHMIDT, S. L. et al. The effects of overfeeding on spontaneous physical activity in obesity prone and obesity resistant humans. **Obesity (Silver Spring, Md.)**, v. 20, n. 11, p. 2186–93, may 2012.

SHIMAZU, T. et al. Increase in body mass index category since age 20 years and all-cause mortality: a prospective cohort study (the Ohsaki Study). **International journal of obesity (2005)**, v. 33, n. 4, p. 490–6, feb. 2009.

SIMONČIČ, M. et al. Obesity resistant mechanisms in the Lean polygenic mouse model as indicated by liver transcriptome and expression of selected genes in skeletal muscle. **BMC genomics**, v. 12, p. 96, feb. 2011.

SMITH, P. M. et al. AT1 receptor blockade alters nutritional and biometric development in obesity-resistant and obesity-prone rats submitted to a high fat diet. **Frontiers in psychology**, v. 5, n. July, p. 832, jul. 2014.

SMUTOK, M. A. et al. Effects of Exercise Training Modality on Glucose Tolerance in Men with Abnormal Glucose Regulation. **International Journal of Sports Medicine**, v. 15, N. 6, P. 283-289, aug. 1994.

SOLOVEVA, V. et al. Transgenic Mice Overexpressing the β 1-Adrenergic Receptor in Adipose Tissue Are Resistant to Obesity. **Mol Endocrinol**, v. 11, n. 1, p. 27–38, oct. 1997.

STEIN, C. J.; COLDITZ, G. A. The epidemic of obesity. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 89, n. 6, p. 2522–2525, mar. 2004.

TAYLOR, B. A; PHILLIPS, S. J. Detection of obesity QTLs on mouse chromosomes 1 and 7 by selective DNA pooling. **Genomics**, v. 34, n. 3, p. 389–98, apr. 1996.

TESKE, J. A.; BILLINGTON, C. J.; KOTZ, C. M. Mechanisms underlying obesity resistance associated with high spontaneous physical activity. **Neuroscience**, v. 256, p. 91–100, oct. 2014.

TULIPANO, G. et al. Characterization of the resistance to the anorectic and endocrine effects of leptin in obesity-prone and obesity-resistant rats fed a high-fat diet. **Journal of Endocrinology**, v. 183, n. 2, p. 289–298, aug. 2004.



ULLRICH, N. D.; VALDIVIA, H. H.; NIGGLI, E. PKA phosphorylation of cardiac ryanodine receptor modulates SR luminal Ca^{2+} sensitivity. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 53, n. 1, p. 33–42, apr. 2012.

URTHALER, F. W. Maximal twitch tension in intact length-clamped ferret papillary muscles evoked by modified postextrasystolic potentiation. **Circulation Research**, v. 62, p. 65–74, jul. 1988.

VEYRAT-DUREBEX, C. et al. Alterations in lipid metabolism and thermogenesis with emergence of brown adipocytes in white adipose tissue in diet-induced obesity-resistant Lou/C rats. **Am J Physiology Endocrinology Metabolism**, v. 300, p. 1146–1157, mar. 2011.

VGONTZAS, A. N. et al. Chronic insomnia is associated with a shift of interleukin-6 and tumor necrosis factor secretion from nighttime to daytime. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 51, n. 7, p. 887–892, jul. 2002.

WANG, S. et al. Swimming training can affect intrinsic calcium current characteristics in rat myocardium. **European Journal of Applied Physiology**, v. 104, n. 3, p. 549–555, jul. 2008.

WANG, Y.; WISLOFF, U.; KEMI, O. J. Animal models in the study of exercise-induced cardiac hypertrophy. **Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca**, v. 59, n. 5, p. 633–644, apr. 2010.

WHITE, P. A. S. et al. Modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica e associada à resistência à ação da insulina e intolerância à glicose. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 57, n. 5, p. 339–345, jan. 2013.

WISLØFF, U. et al. Increased contractility and calcium sensitivity in cardiac myocytes isolated from endurance trained rats. **Cardiovascular Research**, v. 50, n. 3, p. 495–508, jan. 2001.

WISLØFF, U. et al. Aerobic exercise reduces cardiomyocyte hypertrophy and increases contractility, Ca^{2+} sensitivity and SERCA-2 in rat after myocardial infarction. v. 54, p. 162–174, nov. 2002.

XIA, S.-F. et al. Role of thyroid hormone homeostasis in obesity-prone and obesity-resistant mice fed a high-fat diet. **Metabolism: clinical and experimental**, v. 64, n. 5, p. 566–79, dec. 2015.



YAMATO, T. et al. Postrest contraction in the ventricular papillary muscle of spontaneously diabetic WBN/Kob rat. **Experimental animals / Japanese Association for Laboratory Animal Science**, v. 50, n. 1, p. 19–31, jun. 2001.

